

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2001年8月16日 (16.08.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/59107 A1(51) 国際特許分類: C12N 15/12, C07K 14/47, C12N  
1/21, 5/10, C12P 21/02, C07K 16/28, C12P 21/08, A01K  
67/027, A61K 45/00, A61P 9/10, 3/06, 3/10(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 扶桑薬品  
工業株式会社 (FUSO PHARMACEUTICAL INDUS-  
TRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府大阪市中央  
区道修町一丁目7番10号 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/00874

(72) 発明者: および

(22) 国際出願日: 2001年2月8日 (08.02.2001)

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 若宮伸隆  
(WAKAMIYA, Nobutaka) [JP/JP]; 〒567-0826 大阪府  
茨木市大池一丁目9-20 Osaka (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(74) 代理人: 角田嘉宏, 外(SUMIDA, Yoshihiro et al.); 〒  
650-0031 兵庫県神戸市中央区東町123番地の1 貿易  
ビル3階 有古特許事務所 Hyogo (JP).

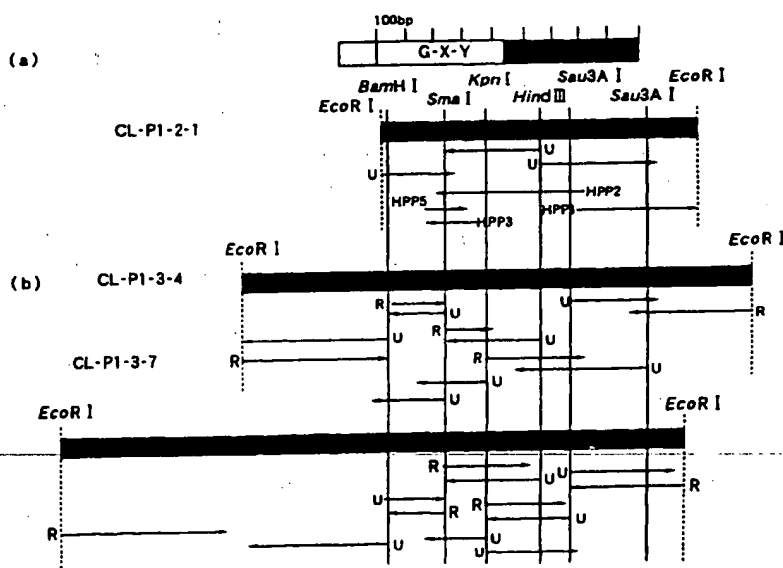
(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2000-35155 2000年2月14日 (14.02.2000) JP  
特願2000-309068  
2000年10月10日 (10.10.2000) JP(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,  
IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,  
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL,

[続葉有]

(54) Title: NOVEL SCAVENGER RECEPTORS

(54) 発明の名称: 新規スカベンジャーレセプター



WO 01/59107 A1

(57) Abstract: Novel scavenger receptors having an SR structure and a collectin-like structure which are proteins having the amino acid sequences of SEQ ID NOS:2, 4 and 24 or proteins having comparable properties thereto, which are usable in clarifying the functions of macrophages and basal immunity, in clarifying the onset mechanisms of various diseases such as arteriosclerosis, diabetic complications, re-constriction after angioplasty and bacterial infection, in diagnosing, preventing and treating these diseases and in developing reagents and drugs therefor; and molecules related thereto such as derivatives or fragments thereof, isolated polynucleotides containing base sequences encoding the same, antibodies and antagonists. A treatment method by using these receptors is also disclosed.



PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,  
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

---

(57) 要約:

マクロファージおよび基礎免疫の機能の解明、動脈硬化、糖尿病性合併症、血管形成後再狭窄、細菌感染症等の各種疾患の発症機構の解明、さらにその診断、予防および治療法、ならびにそれらのための試薬や医薬の開発に利用できる、S R 構造およびコレクチン構造を有する新規スカベンジャーレセプターである、配列番号 2、4 または 24 のアミノ酸配列を有するタンパク質またはこれと同等の性質を有するタンパク質、または、これらの誘導体もしくは断片とそれをコードする塩基配列を含む単離されたポリヌクレオチド、および抗体、アンタゴニスト等の関連分子を提供する。これらを用いた処置方法も開示する。

## 明 細 書

## 新規スカベンジャーレセプター

## 5      〔技術分野〕

本発明は単離されたヒトおよびマウスの新規スカベンジャーレセプター（本明細書において各々「hSRCL-P1」および「mSRCL-P1」と称し、両者を区別しない場合は単に「SRCL-P1」と称する。

10      )遺伝子およびタンパク質、それらの相同体、変異体、修飾体および多形性変種（これらを総じて「誘導體」と称する）、それらの断片（以下、それら全てを「SRCL-P1s」と称する）ならびにそれらの検出に関する。また、SRCL-P1sを含む医薬用、診断用、研究用組成物、それらの製造方法および使用に関する。更には、SRCL-P1sタンパク質のアゴニストおよびアンタゴニスト、SRCL-P1sを用いた薬物のスクリーニング方法に関する。更には、SRCL-P1s遺伝子を含む発現ベクター、該発現ベクターによって形質転換された形質転換細胞、SRCL-P1タンパク質に対する抗体および該抗体を産生する細胞に関する。

## 15      〔背景技術〕

アテローム性動脈硬化症の初期病変における病理学的な特徴は、泡沫細胞が動脈壁において増加する現象である。マクロファージの細胞膜上に存在するスカベンジャー受容体（以下、SRと称する）（Krieger, M. et al. ; Annu. Rev. Biochem., 63, 601-637, 1994）は、LDL受容体とは異なりコレステロールによる負のフィードバック調節を欠き、変性されたLDL（コレステロールとリポ蛋白質との複合体である低比重リポ蛋白質）  
25      を積極的に細胞内へ取り込むことにより自身は泡沫細胞へと変化し血管内

皮細胞下に蓄積する。ゆえに、マクロファージおよびそのSRはアテローム性動脈硬化の病態形成に重要な役割を果たすと考えられている (Brown, M. S. et al. ; Nature, 343, 508-509, 1990、Kurihara, Y. A. et al. ; Current Opinion in Lipidology, 2, 295-300, 1991、Krieger, M. ; TIBS, 17, 141-146, 1992、Krieger, M. et al. ; J. Biol. Chem., 268(7), 4569-4572, 1993)。

糖尿病により生ずる生体内での持続的な高血糖は、種々の蛋白の非酵素的糖化を引き起こし、シッフ塩基・アマトリ化合物を経て糖化過程における最終産物であるメイラード反応後期生成物 (AGE: advanced glycation end products) を産生させる。細胞障害作用を有するAGEはAGE受容体を介してマクロファージ、血管内皮細胞、肝細胞、腎メサンギウム細胞等に結合し生体に悪影響を与える。例えば、AGEがマクロファージに結合すると、TNF (Tumor Necrosis Factor)、IL-1 (Interleukine-1) および血小板由来増殖因子 (PDGF) 等のサイトカインの分泌を促進し、糖尿病性合併症に特徴的な細胞障害を惹起させることが知られている。SRがAGEの取り込み・分解に関与する受容体の一つであること (Araki, N. et al. ; Eur. J. Biochem., 230, 408-415, 1995、Suzuki, H. et al. ; Circulation, 92, 1-428, 1995)、SRダブルノックアウトマウスではAGEの分解活性が1/3に低下していることから、SRは糖尿病性腎症、糖尿病性網膜症、糖尿病性神経障害等の糖尿病性合併症にも深く関与していると考えられている。また、ラットにAGEアルブミンを過剰に投与すると腎にAGEが沈着し、糸球体硬化症を惹起することから (Vlassara, H. et al. ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 11704-11708, 1994)、AGEを認識するSRが糸球体硬化症に深く関与すると予想される。

さらに、SRはアルツハイマー病にも関与していると考えられている。アルツハイマー病の病理学的特徴はβアミロイドが沈着した老人斑である

## 3

。βアミロイドは小膠細胞上に発現しているSRを介して小膠細胞を活性化し活性酸素を発生させ、神経毒性を発現することが報告されている（Nature, 382, 716-719, 1996）。

SRのリガンドとしては、SR分子種の違いにより特異性に差異が存在するものの、陰性電荷を有するリガンド、例えばアセチル化LDL (AcLDL)、酸化LDL (OxLDL) などの変性LDL、マレイル化BSA等の変性蛋白質、ポリイノシン酸等の四重らせん核酸、デキストラン硫酸およびフコイダン等の多糖類、フォスファチジルセリンおよびフォスファチジルイノシトール等の酸性リン脂質、エンドトキシン (LPS)、AGE、老化細胞およびアポトーシス細胞等が挙げられる。またSRは生体内で種々の変性物、ウィルス等の異物等を広く認識することから異物および老廃物の除去等に重要な役割を担っていると考えられている (Hampton, R. Y. et al. ; Nature, 352, 342-344, 1991、Tokuda, H. et al. ; Biochem. Biophys. Res. Commun., 196(1), 8-24, 1993、Pearson, A. M. et al. ; J. Biol. Chem., 268, 3546-3554, 1993、Dunne, D. W. et al. ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 1863-1867, 1994、Freeman, M. W. ; Current Opinion in Lipidology, 5, 143-148, 1994)。

SRは、マクロファージの他に肝類洞内皮細胞 (Eskild, W. et al. ; Elsevier Biomedical N.Y., 255-262, 1982)、血管内皮細胞 (Baker, D. P. et al. ; Arteriosclerosis, 4, 248-255, 1984、Bickel, P. E. et al. ; J. Clin. Invest., 90, 1450-1457, 1992)、血管平滑筋細胞 (Pitas, R. E. et al. ; J. Biol. Chem., 265, 12722-12727, 1990、Bickel, P. E. et al. ; J. Clin. Invest., 90, 1450-1457, 1992)、繊維芽細胞 (Pitas, R. E. et al. ; J. Biol. Chem., 265, 12722-12727, 1990) 等に発現している。また、SRはSRA、SRB、SRC (Pearson, A. et al. ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 4056-4060, 1995)、

## 4

Fc $\gamma$ RIIB2 (Stanton, L. W. et al. ; J. Biol. Chem., 270, 22446-22451, 1992) および macrosialin (CD68) (Ramprasad, M. P. et al. ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 9580-9584, 1995)、ヒト血管内皮OxLDL受容体 (LOX-1:lectin-like oxidized LDL receptor) (Sawamura, T. et al. ; Nature, 386, 73, 1997) に分類され、さらに SRAは SR-AIおよび SR-AII (Kodama, T. et al. ; Nature, 343, 531-535, 1990) ならびに MARCO (a novel macrophage receptor with collagenous structure) (Elomaa, O. et al. ; Cell, 80, 603-609, 1995)、SRBは CD36 (Endemann, G. et al. ; J. Biol. Chem., 268, 11811-11816, 1993) および SR-BI (Acton, S. L. et al. ; J. Biol. Chem., 269, 21003-21009, 1994) に分類される。

SR-AIおよび SR-AIIはホモトリマーであり、N末端側を細胞内に有する inside-out型の膜貫通蛋白質である。該蛋白質の細胞外には、コラーゲン様ドメイン、 $\alpha$ -helical coiled coilドメインおよびシステインリッチドメイン等の構造上数個のドメインが認められる (Rohrer, L. et al. ; Nature, 343, 570, 1990、Matsumoto, A. et al. ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 9133, 1990)。コラーゲン様ドメインはコラーゲンに特有な (Gly-Xaa-Yaa) $_n$ 構造 (XaaおよびYaaはいかなるアミノ酸残基であってもよい) を有しており、該ドメインはリガンド結合部位として機能している。 $\alpha$ -helical coiled coilドメインは7アミノ酸ごとに2回転する右巻のヘブテッドリピート、すなわち $\alpha$ -helical coiled coil構造をとり、3本のポリペプチドは7アミノ酸ごとに存在するロイシンやイソロイシン等の疎水性アミノ酸を内側に向け、極性アミノ酸や糖鎖結合部位を外側にして (ロイシンジッパー) ホモトリマーを形成している。該ドメインが有する役割として、ホモトリマー構造の維持、また、変性LDL等のリガンドと結合し細胞内に入れ、エンドソーム内のpHの低下に依存して受

容体の3次構造を変化させ、リガンドを解離させる役割を有する。

該タンパク質の細胞質内ドメインはLDL受容体やインスリン受容体に見られるNPXY配列およびトランスフェリン受容体に見られるYXRF配列と同様のエンドサイトーシスシグナルに見られる特徴的なタイトターン構造を有し、これらの配列を欠損させるとエンドサイトーシスが抑制されることが示されている。

S R-AIおよびS R-A2は、システインリッチドメインをコードするmRNAのオルターナティブスプライシングにより生じ、S R-AIは該ドメインが110個のアミノ酸から成り、S R-AIIは17個のアミノ酸から成る。

S R-AIおよびS R-AIIは、少なくとも末梢単球由来マクロファージ、肺胞マクロファージおよび肝Kupffer細胞に発現しており、生体防御・動脈硬化・Caイオン非依存性の細胞接着等に関わることが明らかとなっている

(Krieger, M. et al. ; Annu. Rev. Biochem., 63, 601-637, 1994, Wada, Y et al. ; Ann. N.Y. Acad. Sci., 748, 226-239, 1995, Fraser, I. P. et al. ; Nature, 364, 343, 1993)。さらに、OxLDLは動脈硬化巣のマクロファージ細胞内に存在し、該マクロファージの細胞膜上にはS R-AIおよびS R-AIIが強く発現すること、S R-AIのトランスジェニックマウスにおいては脂質負荷による血中リポ蛋白質の上昇が抑えられること、OxLDLの取り込みにはS R-AIおよびS R-AIIの役割が重要であると考えられる。

一方、S R-AIに分類されるMACROはS R-AIと類似の構造を有しているが、 $\alpha$ -helical coiled coilドメインは存在せず、長いコラーゲン様ドメインを有することを特徴とする。MACROは脾臓マクロファージやリンパ節マクロファージ等において発現しており、そのリガンドの特異性から細菌感染に対する生体防御機構として機能していると考えられる。

鈴木らは、S R-AIおよびS R-AIIの共通部分である第4エクソンをネ

オマイシン耐性遺伝子に置換し、SRAノックアウトマウスの作製に成功している (Suzuki, H. et al. ; Nature, 386, 292-296, 1997) 。 SRAノックアウトマウスは野生型と比較して免疫障害が認められ、リステリアおよび単純ヘルペスウィルスの感染率が高い。また、アポトーシスを起こしたT細胞の貪食にはSRAが関与し、SRAノックアウトマウスにおいては野生型と比較してその貪食能が低下することが示されている (Platt, N. et al. ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 12456, 1996) 。 さらに、SRAノックアウトマウスと動脈硬化の動物モデルであるアポE欠損マウス (Plump, A. S. et al. ; Cell, 71, 343, 1992、Zhag, S. H. et al. ; J. Clin. Invest., 94, 937, 1994) とを交配することにより得られるダブルノックアウトマウスでは、動脈硬化巣の面積がアポE欠損マウスのそれよりも有意に小さいことが示されている (Suzuki, H. et al. ; Nature, 386, 292-296, 1997) 。

この様に、SRはマクロファージの機能の解明、動脈硬化、糖尿病性合併症およびAD、高 $\beta$ リボ蛋白血症、高コレステロール血症、高トリグリセライド血症、低 $\alpha$ リボ蛋白血症、移植、アテレクトミーおよび血管形成後再狭窄等を始めとする各種疾患等の発症機構の解明、さらにその診断、予防および治療法、ならびにそれらのための試薬や医薬の開発に利用できるものであり、このファミリーに属する新規分子種の発見は、上記課題を解決する手段となり得る。

一方、生体防御に重要な役割を担っている補体系は免疫グロブリンを認識分子とし、補体第一成分であるC1が活性化される古典的経路および細菌等の異物に補体第三成分であるC3が直接結合する第二経路が知られている。近年これらの補体活性化経路に加えて、血清レクチンであるマンノース結合蛋白質 (以下、MBPと称する) が異物表面の糖鎖を直接認識し結合することにより補体系を活性化させるレクチン経路が明らかにされた (Sa



to, T. et al. ; Int. Immunol., 6, 665-669, 1994) 。

MBPはCaイオン存在下、マンノースやN-アセチルグルコサミン等に特異的に結合するC型レクチンであり、その構造は少なくとも(Gly-Xaa-Yaa)<sub>n</sub>から成るコラーゲン様領域、糖鎖認識領域(CRD)を含んでいる。MBPと同様にコラーゲン様領域およびCRDを有するレクチンはコレクチンと総称され(Malhotra, R. et al. ; Eur. J. Immunol., 22, 1437-1445, 1992)、MBP以外にコレクチン-43(CL-43)、サーファクタント蛋白質A(SP-A)、サーファクタント蛋白質D(SP-D)およびウシコングルチニン(BKg)等を挙げることができる。コレクチンはオプソニン活性を有し、細菌、ウィルスを始めとする様々な微生物に対する基礎免疫に関与していると考えられている(Kawasaki, N. et al. ; J. Biochem., 106, 483-489, 1989、Ikeda, K. et al. ; J. Biol. Chem., 262, 7451-7454, 1987、Ohta, M. et al. ; J. Biol. Chem., 265, 1980-1984, 1990、Summerfield, J. A. et al. ; Lancet, 345, 886, 1995) 。

これらのコレクチンは、図1(a)に示すような、(1)CRDおよび(2)コラーゲン様領域等の特徴的な領域を含む基本構造から構成されていることが知られており(Malhortra et al. ; Eur. J. Immunol., 22, 1437-1445, 1992)、この基本構造がコラーゲン様領域においてトリプルヘリックスを構成することによりサブユニットを形成し、さらにこのサブユニットが3量体、4量体、6量体等のオリゴマー構造を形成している。

最近、コレクチンによる非特異的な免疫応答への関与が示唆され、例えば、母親の移行抗体や特異的防御システムが十分に発達していない小児に対し、種々の微生物の中和作用や排除に重要な役割を果たしているとの報告がなされている(Super et al. ; Lancet, 2, 1236-1239, 1989) 。さらに、宿主の生体防御におけるこれらのコレクチンの役割について、例えば、MBPの遺伝子上の変異に起因したMBPの血中濃度の低下によって、宿主

が感染を受けやすくなるという研究結果が報告されている (Sumiya et al. ; Lancet, 337, 1569-1570, 1991)。また、オプソニン化不全の血清中MBP含量は低値を示し (Madsen, H. O. et al. ; Immuno genetics, 40, 37-44, 1994) 細菌感染を起こしやすいという報告があり (Garred, P. et al. ; Lancet, 346, 941-943, 1995)、MBPは免疫機構において重要な役割を担っていると考えることができる。

本発明者らは、以前にBKgおよびMBPがH1およびH3タイプのインフルエンザA型ウィルスの感染や赤血球凝集活性を阻害することを見出した (Wakamiya et al. ; Glycoconjugate J., 8, 235, 1991, Wakamiya et al. ; Biochem. Biophys. Res. Comm., 187, 1270-1278, 1992)。その後さらに、BKgをコードするcDNAクローンを取得し、BKgとSP-D等との関連性も見出されている (Suzuki et al. ; Biochem. Biophys. Res. Comm., 191, 335-342, 1993)。

このように、コレクチンは、生体防御機構の解明における有用性および生理活性物質としての有用性等が期待される物質であり、このファミリーに属する新規分子種の発見は、感染症の治療の他、種々の医療分野そして生物学の分野にも寄与するところ大である。

#### 〔発明の開示〕

本発明は、マクロファージおよび基礎免疫の機能の解明、動脈硬化、糖尿病性合併症およびアルツハイマー病、高 $\beta$ リポ蛋白血症、高コレステロール血症、高トリグリセライド血症、低 $\alpha$ リポ蛋白血症、移植、アテレクトミーおよび血管形成後再狭窄、細菌感染症等を始めとする各種疾患等の発症機構の解明、さらにその診断、予防および治療法、ならびにそれらのための試薬や医薬の開発に利用できる新規スカベンジャーレセプターを提供することを目的とする。

すなわち、本発明は、

(1) 配列番号2のアミノ酸番号1～742に示すアミノ酸742個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または配列番号2に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2のアミノ酸番号1～742に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、または、これらの誘導体もしくは断片、

(2) 配列番号1の塩基番号74～2299に示す塩基配列、配列番号2のアミノ酸番号1～742に示すアミノ酸配列またはその断片をコードする塩基配列、または、これら塩基配列もしくはこれら塩基配列と相補的な塩基配列と、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号2のアミノ酸番号1～742に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む単離されたポリヌクレオチド、

(3) 配列番号24のアミノ酸番号1～618に示すアミノ酸から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または配列番号24に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号24のアミノ酸番号1～618に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、または、これらの誘導体もしくは断片、

(4) 配列番号23の塩基番号74～1933に示す塩基配列、配列番号24のアミノ酸番号1～618に示すアミノ酸配列またはその断片をコードする塩基配列、または、これら塩基配列もしくはこれら塩基配列と相補的な塩基配列と、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号24のアミノ酸番号1～618に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む単離されたポリヌクレオチド、

(5) 配列番号4のアミノ酸番号1～742に示すアミノ酸742個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または配列番号2に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2のアミノ酸番号1～742に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、または、これらの誘導体もしくは断片、

(6) 配列番号3の塩基番号74～2299に示す塩基配列、配列番号2のアミノ酸番号1～742に示すアミノ酸配列またはその断片をコードする塩基配列、または、これら塩基配列もしくはこれら塩基配列と相補的な塩基配列と、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号2のアミノ酸番号1～742に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む単離されたポリヌクレオチド、

(7) (2)、(4)または(6)に記載のポリヌクレオチドを含むことを特徴とするベクター、

(8) (2)、(4)または(6)に記載のポリヌクレオチドを発現可能に保持する形質転換細胞、

(9) (2)または(4)に記載のポリヌクレオチドで形質転換した細胞を培養し、産生されたhSRC-L-P1タンパク質を採取する工程を含むことを特徴とするタンパク質の製造法、

(10) (6)に記載の塩基配列で形質転換した細胞を培養し、産生されたmSRC-L-P1タンパク質を採取する工程を含むことを特徴とするタンパク質の製造法、

(11) 細胞が大腸菌、動物細胞または昆虫細胞である、(9)または(10)に記載の製造法、

(12) SRC-L-P1遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニ

ック非ヒト動物、

(13) SRCL-P1遺伝子がSRCL-P1をコードするcDNA、ゲノムDNAまたは合成DNAである(12)記載のトランスジェニック非ヒト動物。

5 (14) 遺伝子発現調節部位に変異を起こさせることにより発現レベルを変化させた(13)記載のトランスジェニック非ヒト動物、

(15) mSRCL-P1遺伝子の機能を欠損させたノックアウトマウス

10 (16) (1)、(3)または(5)に記載のタンパク質またはその断片に対する抗体、

(17) ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体またはペプチド抗体である(16)に記載の抗体、

15 (18) ヒト以外の温血動物に(1)、(3)または(5)に記載のタンパク質またはその断片を投与し、抗体価の認められる該動物を選択し、脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することを含む、(1)、(3)または(5)に記載のタンパク質またはその断片に対するモノクローナル抗体の製造方法、

20 (19) (16)または(17)に記載の抗体とSRCL-P1タンパク質またはその断片との免疫学的な結合に基づいて、該タンパク質またはその断片を定量する方法、

(20) (16)または(17)に記載の抗体とSRCL-P1タンパク質またはその断片との免疫学的な結合に基づいて、該タンパク質またはその断片を検出する方法、

25 (21) (1)、(3)または(5)に記載のタンパク質の活性を刺激するアゴニスト、

(22) (1)、(3) または (5) に記載のタンパク質の活性または活性化を阻害するアンタゴニスト、

(23) (1)、(3) または (5) に記載のタンパク質を用いることを特徴とする薬物のスクリーニング方法、

5 (24) (23) に記載のスクリーニング方法によって得られた薬物、

(25) 酸化LDL蓄積に関わる病態を処置するための薬物のスクリーニング方法であって、(1)、(3) または (5) に記載のタンパク質と酸化LDLとの結合量を、候補薬物の存在下および非存在下で比較することにより評価される、当該タンパク質と酸化LDLとの結合に対する候補薬物の阻害能によって、酸化LDL蓄積に関わる病態を処置するための薬物を同定する工程を含むことを特徴とする薬物のスクリーニング方法、

10

(26) (25) に記載のスクリーニング方法によって得られた薬物、

(27) 酸化LDL蓄積に関わる病態を処置する方法であって、(26) に記載の薬物を用いて、SRCL-P1 タンパク質またはその断片と酸化LDLとの結合を阻害する工程を含むことを特徴とする方法、

15

(28) 酸化LDL蓄積に関わる病態を処置するための医薬組成物であって、(26) に記載の薬物を含む医薬組成物、

(29) 細胞へのAGEの結合に関わる病態を処置するための薬物のスクリーニング方法であって、(1)、(3) または (5) に記載のタンパク質とAGEとの結合量を、候補薬物の存在下および非存在下で比較することにより評価される、当該タンパク質とAGEとの結合に対する候補薬物の阻害能によって、細胞へのAGEの結合に関わる病態を処置するための薬物を同定する工程を含むことを特徴とする薬物のスクリーニング方法、

20

(30) (29) に記載のスクリーニング方法によって得られた薬物、

25 (31) 細胞へのAGEの結合に関わる病態を処置する方法であって、(30) に記載の薬物を用いて、SRCL-P1 タンパク質またはその断片と

AGEとの結合を阻害する工程を含むことを特徴とする方法、ならびに

(32) AGEの細胞への結合に関わる病態を処置するための医薬組成物であって、(30)に記載の薬物を含む医薬組成物を提供する。

[図面の簡単な説明]

5 図1は、従来報告されている主なコレクチンの基本構造およびタンパク質の概観を示す図である。

図2は、従来報告されている3種のコレクチンのアミノ酸配列のアラインメントの前半部分を示す図である。

図3は、図2と同様のアラインメントの後半部分を示す図である。

10 図4(b)は、本発明の新規スカベンジャーレセプター-の塩基配列を決定するために使用した各プライマー-の名称と、シーケンサーにより読み取られた塩基配列を示す図であり、図4(a)は、得られた新規コレクチンのORFを示す図である。

15 図5は、A：酵母、B：グラム陰性細菌 (*Escherichia coli*)、およびC：グラム陽性細菌 (*Staphylococcus aureus*) が、hSRC L-P1を発現している細胞に特異的に結合する様子を示す図である。

図6は、A：酸化LDL、B：マンノース、およびC：AGEが、hSRC L-P1を発現している細胞に特異的に結合する様子を示す図である。

20 図7は、酵母がhSRC L-P1を発現している細胞内に取り込まれている様子を示す図である。

図8は、A：健常人およびB：マウスの心臓の血管内皮細胞に、hSRC L-P1が発現されている様子を示す図である。

[発明を実施するための最良の形態]

25 本願発明者は、ヒトおよびマウスの新規SRのクローニングに成功した。新規SR (SRC L-P1) のC末端側には、基礎免疫に関与すると考えられるCRD含有のコレクチンドメインが存在し、さらにその全体構造は

SRA、特にSR-AIに類似していた。具体的には、N末端側より、ロイシン単位が4回繰り返されるロイシンジッパー構造を含む膜貫通ドメイン、 $\alpha$ -helical coiled coilドメイン、コラーゲン様ドメイン、ネックドメイン、CRDドメインから少なくとも構成されるものであった。前記特徴を有する3分子が、coiled coilドメインで $\alpha$ ヘリックスを形成し、コラーゲン様ドメインにてトリプルヘリックスを形成することによりホモトリマーを形成していると考えられる。また、コラーゲン様ドメインは生理的pHの条件下では正の電荷を帯びていると推測される。さらにSRC L-P1タンパク質は多くの糖鎖結合部位を有していた。

10 本明細書において使用するhSRC L-P1遺伝子およびmSRC L-P1遺伝子とは、特記しない限り、配列番号1または3に示す核酸配列を含むポリヌクレオチド、それらの誘導体（相同体、変異体、修飾体および多形性変種）、ならびにそれらの断片を含むものとする。また、本明細書において使用するhSRC L-P1タンパク質およびmSRC L-P1タンパク質とは、特記しない限り、配列番号2または4に示すアミノ酸配列（ポリペプチド）、それらの誘導体、それらの断片を含むものとする。これらは天然または人工的作製を問わない。本発明には前記記載の全てが含まれる。

20 hSRC L-P1の例として、配列番号24に示すアミノ酸を有するタンパク質（配列番号1に示すタンパク質において、コラーゲン領域の一部とネック領域すなわち、第483～606番目のアミノ酸残基が欠失した変異体）を挙げることができ、配列番号1に示すポリヌクレオチドの変異体の例として、配列番号24のタンパク質をコードする、配列番号23に示すポリヌクレオチドを挙げることができる。

25 また、本発明には、実質的に配列番号2または4に示すアミノ酸配列に類似するアミノ酸配列および実質的に配列番号2または4に示すアミノ酸



配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含まれる。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質も含まれる。配列番号2または4に示すアミノ酸配列に実質的に類似するアミノ酸配列とは、配列番号2または4に示すアミノ酸配列を含むタンパク質と同等の性質すなわち、SR

5 に特徴的な、ロイシンジッパー構造を含む膜貫通ドメイン、 $\alpha$ -helical coiled coilドメイン、コラーゲン様ドメインを有することによる活性、機能および3次構造等を有する範囲内で、1もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失、付加および／または挿入等の改変を有するアミノ酸配列をいう。これらは天然または人工的作製を問わない。

10 さらに、本発明には、配列番号1または3のいずれかに記載の核酸配列またはその断片を含む核酸配列、またはこれらに相補的な核酸配列（以下、特定配列と称する）とストリンジントな条件下ハイブリダイズすることができる核酸配列も含まれる。本発明におけるストリンジントな条件

15 とは、例えば、5×SSC、5%デンハート溶液（0.1% BSA、0.1% Ficoll 400、0.1% PVP）、0.5% SDSおよび20  $\mu$ g/ml 変性サケ精子DNAを含有する溶液中で、37℃にて一夜インキュベートし、ついで室温にて0.1% SDS含有2×SSCで洗浄する条件である。SSCの代わりに適宜SPEを使用してもよい。この様にして得られた核酸配列は、少なくとも特定配列と50%以上のホ

20 モロジーを有すると考えられる。特定配列とストリンジントな条件下ハイブリダイズすることができる核酸配列によってコードされるタンパク質は、SRCL-P1タンパク質と同等の性質を持つものが多いと考えられ、SRCL-P1タンパク質と同等の性質を有する限り、該タンパク質も本発明に含まれる。

25 特に、配列番号2に示すhSRCL-P1（アミノ酸番号1～742）のアミノ酸配列はアミノ酸742個から成るタンパク質であり、それをコ

ードする塩基配列は塩基数 2 2 2 6 個から成る。該配列にはロイシンジッ  
バードメイン、 $\alpha$ -helical coiled coilドメイン、コラーゲン様ドメイ  
ン、ネックドメイン、CRDドメイン等の特徴的なアミノ酸配列が存在して  
いた。すなわち、アミノ酸番号 3 6 ~ 5 7 に示すロイシンジッバードメイ  
ン、アミノ酸番号 7 2 ~ 4 2 6 (COILS Program) または 8 1 ~ 4 3 1 (MultiCoil Program) に示す $\alpha$ -helical coiled coilドメイン、アミノ酸  
番号 4 4 3 ~ 5 8 9 に示すコラーゲン様ドメイン、アミノ酸番号 5 9 0 ~  
6 0 6 に示すネックドメイン、アミノ酸番号 6 0 7 ~ 7 4 2 に示すCRDド  
メイン等が存在していた。その他のドメインとしては、例えばアミノ酸番  
号 6 3 ~ 7 4 2 (TMHMM1.0 program) または 5 8 ~ 7 4 2 (TMpred pro  
gram) に示す細胞外ドメイン、アミノ酸番号 1 ~ 3 9 (TMHMM1.0 progr  
am) または 1 ~ 3 7 (TMpred program) に示す細胞内ドメイン、アミノ酸  
番号 4 0 ~ 6 2 (TMHMM1.0 program) または 3 8 ~ 5 7 (TMpred progr  
am) に示す膜貫通ドメイン、アミノ酸番号 4 4 3 ~ 7 4 2 に示すコレクチ  
ン様ドメイン等が挙げられる。さらに、C型レクチンモチーフであるアミ  
ノ酸番号 7 0 8 ~ 7 3 0 が含まれていた。このタンパク質をコードする塩  
基配列を配列番号 1 に示した。

また、配列番号 4 に示す m S R C L - P 1 (アミノ酸番号 1 ~ 7 4 2)  
のアミノ酸配列はアミノ酸 7 4 2 個から成るタンパク質であり、それをコ  
ードする塩基配列は塩基数 2 2 2 6 個から成る。該配列には配列番号 2 に  
示した h S R C L - P 1 と同じく、ロイシンジッバードメイン、 $\alpha$ -he  
lical coiled coilドメイン、コラーゲン様ドメイン、ネックドメイン、  
CRDドメイン、C型レクチンモチーフ等の特徴的なアミノ酸配列が存在し  
ていた。このタンパク質をコードする塩基配列を配列番号 3 に示した。

本明細書中で使用する相同体とは、相同性 (ホモロジー) が高い核酸配  
列またはアミノ酸配列であり、ホモロジーが少なくとも 5 0 % 以上、好ま

しくは70%以上、より好ましくは90%以上のものをいう。配列中に欠失や挿入が存在する場合には、ギャップ結合を許した相同性検索を行うと良い。例えば、マルチプル・アライメント（商品名：SODHO、富士通）の手法を用いて検索することができる。また、相同性検索のアルゴリズムには、最も厳密なSmith-Watermanアルゴリズムを用いることができる。その他、FASTAやBLAST等のインターネットを通じて利用することができる。

本明細書中で使用する変異体とは、例えば、対立遺伝子（アレル）、Single Nucleotide Polymorphism (SNP) 等を挙げることができる。また、核酸配列の変異はコドンの縮重の範囲内で変化したものも本発明の核酸配列に含まれる。核酸配列のコドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドから成るプライマーを利用した部位特異的変異導入法 (Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81, 5662, 1984) 等に従って行うことができる、得られた人工的遺伝子変異体も本発明の核酸配列に含まれる。また、コドンの縮重の範囲を超えた場合であっても、変異したコドンによって翻訳された変異アミノ酸が、正常アミノ酸と類似の性質であることが好ましい。例えば、脂肪族アミノ酸であるアラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシン間での変異、中性アミノ酸であるグリシン、アラニン、セリン、トレオニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、システイン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、プロリン、トリプトファン、アスパラギンおよびグルタミン間での変異、酸性アミノ酸であるアスパラギン酸およびグルタミン酸間での変異、塩基性アミノ酸であるアルギニン、リジンおよびヒスチジン間での変異、水酸基を有するセリンおよびトレオニン間での変異、芳香環を有するフェニルアラニンおよびチロシン間での変異等、アミノ酸の性質・機能・特性等が類似のものであるのが好ましい。これら人工的または天然に変異したタンパク質も本発明のタンパク質に含まれる。人工的には、P

CR法を用いて部位特異的変異を起こすことができ、その他公知の方法を用いて任意の場所に変異を起こさせることができる。

本明細書中で使用する修飾体とは、例えば、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、ミリストイル化、グリコシル化、水酸化、リン酸化、硫酸化、ホルミル化、メチル化、ポリエチレングリコール化、脂質結合、ヌクレオチド結合、金属結合（カルシウム付加体等）、多くのタンパク質（アルブミン等）との融合体、二量体等の改変を通常の技術を用いて施すことができる。例えば、グリコシル化は宿主が大腸菌では起こらないため、グリコシル化を企図する場合には、真核細胞に発現すると良い。昆虫細胞も哺乳細胞と同様に翻訳後にグリコシル化を行うため使用することができる。

本明細書中で使用する多型性変種とは、例えば、染色体DNAの構造や形態の差異により生じる多型性、ある遺伝子に対立遺伝子に変化したために生じる多型性等をいう。一般に真核生物の遺伝子は多形現象を示すことが多く、この現象によって1個あるいはそれ以上のアミノ酸が置換される場合もあり、また、その場合であってもタンパク質の活性が保持される場合もある。ゆえに、配列番号2または4のいずれかに示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子を人工的に改変したものを用いて得られたタンパク質をコードする遺伝子は、該タンパク質が本発明の遺伝子の特徴的な機能を有する限り全て本発明に含まれる。さらに、配列番号2または4のいずれかに示されるアミノ酸配列を人工的に改変したタンパク質は、本発明のタンパク質の特徴を有する限り全て本発明に含有される。改変とは、置換、欠失、付加および／または挿入を含むと解する。

本明細書中で使用する断片とは、例えば、上述したSRC1-P1が有するアミノ酸配列中の任意の断片を意味し、例えば、細胞外ドメイン、細胞内ドメイン、膜貫通ドメイン、ロイシンジッパードメイン、 $\alpha$ -heli

cal coiled coilドメイン、コラーゲン様ドメイン、ネックドメイン、CRDドメイン、コレクチン様ドメイン、疎水性ドメイン（ネックドメイン、膜貫通ドメイン等）、親水性ドメイン（疎水性ドメイン以外）等を挙げることができ、またこれら断片を融合させた断片挙げることができる。例えば、配列番号2に示すhSRCL-P1アミノ酸配列において、膜貫通ドメインを欠き可溶性受容体を形成する58乃至63番目から742番目のアミノ酸を有する断片、CRDドメインを欠き膜貫通型スカベンジャーレセプターを形成する約1～606番目のアミノ酸を有する断片、ロイシンジッパードメインと $\alpha$ -helical coiled coilドメインから成る可溶性スカベンジャーレセプターを形成する約36番目から426乃至431番目のアミノ酸を有する断片、ならびにCRDドメインとネックドメインを除く第1～589番目のアミノ酸を有する断片等を挙げることができる

#### SRCL-P1遺伝子取得方法

本発明のSRCL-P1遺伝子はいかなる方法で得られるものであっても良い。例えば、本発明のSRCL-P1をコードする塩基配列は、該タンパク質を発現している細胞からmRNAを調製して、常法により二本鎖DNAに変換して得ることができる。mRNAの調製にはグアニジンイソチオシアネート・塩化カルシウム法 (Chirwin, et al., Biochemistry, 18, 5294, 1979) 等を用いることができる。全RNAからのポリ(A) RNAの調製はオリゴ(dT)を結合した担体、例えばセファロースあるいはラテックス粒子等を用いたアフィニティークロマトグラフィー等を用いて行うことができる。上記のごとくして得られたRNAを鋳型にして、3'末端に存在するポリ(A)鎖に相補的なオリゴ(dT)またはランダムプライマーあるいはSRCL-P1のアミノ酸配列の一部に相応する合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして逆転写酵素で処理し (Mol. Cell Biol., 2, 161, 1982, Mol. Cell Biol., 3, 280, 1983, Gene,

25, 263, 1983)、この様にして得られたcDNA鎖を、例えばE. coli RNaseH、E. coli DNA polymerase I、E. coli DNA ligaseで処理し、DNA鎖に変換することにより、二本鎖cDNAを得ることができる。このcDNAをプラスミドベクター、ファージベクター、コスミドベクターに組み込み、大腸菌を形質転換して、あるいはインビトロパッケージングを施した後、大腸菌にトランスフェクトすることによりcDNAライブラリーを作製することができる。

ここで用いることができるプラスミドベクターとしては、宿主内で複製保持されるものであれば特に制限されなく、ファージベクターについても宿主内で増殖できるものであれば特に制限されない。クローニング用ベクターとして、例えば、pBR322、pUC19、 $\lambda$ gt10、 $\lambda$ gt11等が挙げられる。また、免疫学的スクリーニングに供する場合には、宿主内でSRC1-P1遺伝子を発現させることができるプロモーターを有するベクターであることが好ましい。

15      プラスミドにcDNAを組み込む方法としては、Maniatisらの方法 (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition) 等を参考にすることができる。また、ファージベクターにcDNAを組み込む方法としては、Hyunhらの方法 (DNA cloning, a practical approach, 1, 49, 1985) 等を参考にすることができる。

20      上記発現ベクターの宿主細胞への導入法としては、例えば、リボポリアミン法、DEAE-デキストラン法、ハナハン法、リボフェクチン法、リン酸カルシウム法によるトランスフェクション、マイクロインジェクションおよびエレクトロポレーション等の方法 (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition) がある。インビトロパッケージング  
25      は、市販のキット (Stratagene社製、Amersham社製) を用いることによって簡便に行うことができる。

上記方法によって作製された cDNA ライブラリーから、SRCL-P  
1 タンパク質をコードする cDNA を単離する方法は、一般的な cDNA  
スクリーニング方法を組み合わせて行うことができる。例えば、<sup>32</sup>P で標  
識したプローブを作製し、コロニーハイブリダイゼーション法 (Proc.  
5 Natl. Acad. Sci. USA, 72, 3961, 1975)、ブランクハイブリダイゼーシ  
ョン法 (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition,  
Cold Spring Harbor Laboratory, 2, 108, 1989) により目的の cDNA  
を含有するクローンをスクリーニングすることができる。また、PCR 法  
によりクローンを選択することもできる。さらに、cDNA を発現しうる  
10 ベクターを用いて cDNA ライブラリーを作製した場合には、SRCL-P  
1 を認識する抗体を用いることにより目的のクローンを選択することが  
できる。

また、SRCL-P 1 遺伝子を発現する細胞より SRCL-P 1 遺伝子  
を単離する際には、例えば、該発現細胞を SDS またはプロテナーゼ K を  
15 用いて溶解し、フェノール処理を行う。不用の RNA をリボヌクレアーゼに  
より消化する。得られる DNA を制限酵素により消化し、得られる DNA  
断片をファージまたはコスミドで増幅してライブラリーを作製する。その  
後、目的のクローンを選択し、SRCL-P 1 遺伝子を取得することがで  
きる。

20 この様にして得られた DNA の塩基配列はマキシム・ギルバート法 (  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 560, 1977) またはサンガー法 (Pro  
c. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463, 1977) によって決定することがで  
きる。SRCL-P 1 遺伝子は、上記得られたクローンから制限酵素等によ  
って切り出すことにより得ることができる。

25 SRCL-P 1 塩基配列をもとに合成したプライマーを用いて、SRC  
L-P 1 発現細胞ポリ (A) + RNA を鋳型にして RT-PCR 法により

クローニングすることも可能である。また、PCRによらず、SRCL-P1塩基配列をもとにプローブを作製・合成し、直接cDNAライブラリーをスクリーニングし、目的とするcDNAを得ることもできる。本発明の遺伝子を、これらの方法により得られた遺伝子の中から、その遺伝子の塩基配列を確認することにより選択することができる。本発明の遺伝子は、例えばホスホイミダイト法 (Mattenczi, M. D. et al., J. Am. Chem. Soc., 130, 3185, 1981) 等の核酸化学合成を用いる常法に従って製造することもできる。

#### 発現ベクターの作製方法

10 本発明はまた、SRCL-P1s核酸配列を含むことを特徴とするベクターにも関する。ベクターは例えば、SRCL-P1sタンパク質を発現することができるものであれば特に制限されないが、プラスミドベクター、RNAベクター、DNAベクター、ウィルスベクター、ファージベクター等を用いることができる。具体的には、Invitrogen社製のpBAD/His、pRSETA、pcDNA2.1、pTrcHis2A、pYES2、pBlueBac4.5、pcDNA3.1、pSecTag2、Novagen社製のpET、pBAC、Promega社製のpGEM、Stratagene社製のpBluescriptII、pBS、Phagescript、pSG、pSV2CATもしくはPharmacia社製のpGEX、pUC18/19、pBPV、pSVK3、pSVL等が挙げられる。

発現ベクターにライゲーションしたSRCL-P1scDNA配列は、プロモーターに機能的に連結させる。プロモーターは例えば、ファージλPLプロモーター、E.coli lac、trp、tacプロモーター、SV40初期および後期プロモーター、T7およびT3プロモーター、レトロウィルスLTRプロモーターが挙げられる。特に、真核細胞に使用するプ



ロモーターとしては、CMVプロモーター、HSVプロモーター、SV40初期および後期プロモーター、レトロウィルスLTRプロモーター、RSVプロモーター、メタロチオネインプロモーターがある。また、発現ベクターは、形質転換した宿主を選択可能にすべきマーカーおよびエンハンサーを含有しても良い。マーカーには、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子等がある。エンハンサーには、SV40エンハンサー、サイトメガロウィルス初期エンハンサープロモーター、アデノウィルスエンハンサー等がある。

#### 形質転換細胞の作製方法

さらに、本発明は上記したようなベクターによりこれらが保持する本発明の塩基配列を発現可能に保持する形質転換細胞を提供する。本明細書における形質転換細胞に用いる宿主細胞としては、好ましくは動物細胞および昆虫細胞であるが、本発明の発現ベクター中のSRC L-P1sタンパク質を発現することが可能な全ての細胞（微生物を含む）が挙げられる。

本明細書における動物細胞もしくは昆虫細胞としては、それぞれヒト由来の細胞、ハエもしくはカイコ由来の細胞が挙げられる。例えば、CHO細胞、COS細胞、BHK細胞、Vero細胞、ミエローマ細胞、HEK 293細胞、HeLa細胞、Jurkat細胞、マウスL細胞、マウスC127細胞、マウスFM3A細胞、マウス繊維芽細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、S2、Sf9、Sf21、High Five<sup>TM</sup>（登録商標）細胞等がある。本明細書における微生物とは、大腸菌もしくは酵母等が含まれる。これら宿主への導入は上記記載した方法を用いることができる。

本発明のSR発現細胞は、動脈硬化発症等に関わるSR経路について、この経路から細胞へ取り込まれる修飾されたLDLの特異性を解析するために用いることができる。また、物質の受容体を介した細胞への取り込み解析のためのモデルとして有用である。さらに、本発明の細胞は動脈硬化症

の治療薬、例えばLDL変性の抑制剤、アシルCo-Aコレステロールアシルトランスフェラーゼ（ACAT）活性阻害剤等の開発過程における薬剤のスクリーニングに用いることができる。また、糖鎖のあるヒトSR蛋白質の製造に用いることができる。また、SRを介する異物もしくは変性物の処理の過程の実験系、または変性アルブミンに伴って感染を起こすB型ウィルス等の感染実験系として用いることができる。

#### タンパク質取得方法

本発明は、上記したような本発明の塩基配列で形質転換した細胞を培養し、産生されたSRC L-P 1を採取する、SRC L-P 1の製造法にも関する。細胞の培養、タンパク質の分離、精製も、自体公知の方法によって行うことができる。

本発明のタンパク質は、それ自体、単離・精製・認識しやすいように組換え融合タンパク質として発現させることができる。組換え融合タンパク質とは目的タンパク質をコードする核酸配列により発現されたタンパク質のN末端側または／およびC末端側に適当なペプチド鎖を付加して発現させたタンパク質である。発現したタンパク質の精製を容易にする目的で、細胞外分泌シグナルを有する融合タンパク質として発現させても良い。また、タンパク質は、各種原料、例えば培養細胞、培養組織、形質転換細胞等のタンパク質産生原料から従来公知の方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿法等の塩析、セファデックス等によるゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー法、疎水性クロマトグラフィー法、色素ゲルクロマトグラフィー法、電気泳動法、透析、限外濾過法、アフィニティークロマトグラフィー法および高速液体クロマトグラフィー法等の公知の精製方法を用いて得ることができる。

#### 遺伝子利用方法

配列番号1または3のいずれかに記載の塩基配列に基づいて、SRC L

ー P 1 遺伝子を検出するためのプローブを設定することができる。あるいは、これらの塩基配列を含む DNA や RNA を増幅するためのプライマーを設定することができる。与えられた配列をもとにプローブやプライマーを設定することは当業者が日常的に行っている。設定された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを化学合成によって得ることができる。そしてそのオリゴヌクレオチドに適当な標識を付加すれば、様々な形式のハイブリダイゼーションアッセイに利用することができる。あるいは PCR の様な核酸の合成反応に利用することができる。プライマーに利用するオリゴヌクレオチドは少なくとも 10 塩基、好適には 15 ～ 50 塩基の長さとするのが望ましく、プローブに利用するオリゴヌクレオチドは 100 塩基から全長の長さであることが望ましい。また、SRC L-P 1 タンパク質をコードする遺伝子変異の検出および SNP の検出等にも用いることができることから、SRC L-P 1 遺伝子変異によって生ずる疾患の診断に用いることができる。例えば、動脈硬化、糖尿病性合併症およびアルツハイマー病、高  $\beta$  リボ蛋白血症、高コレステロール血症、高トリグリセライド血症、低  $\alpha$  リボ蛋白血症、移植、アテレクトミーおよび血管形成後再狭窄、細菌感染症等を始めとする各種疾患等の診断に利用できるものと予想される。また、SRC L-P 1 遺伝子を生体内に導入し発現させることによる遺伝子治療にも有用である。

さらに、本発明が提供する SRC L-P 1 の cDNA 塩基配列に基づいて、ゲノム中に存在する SRC L-P 1 遺伝子のプロモーター領域、エンハンサー領域を取得することも可能である。具体的には特開平 6-181767 号、J. Immunol., 155, 2477, 1995、Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.A., 92, 3561, 1995) 等と同様の方法でこれらの制御領域の取得が可能である。本明細書中で言うプロモーター領域とは転写開始部位の上流に存在する遺伝子の発現を制御する DNA 領域を、エンハンサー領域とはイン

トロン、5' 非翻訳領域、または3' 非翻訳領域に存在する遺伝子の発現を増強するDNA領域を言う。

#### タンパク質利用方法

本発明のSRC L-P1タンパク質は、マクロファージおよび基礎免疫の機能の解明、動脈硬化、糖尿病性合併症およびアルツハイマー病、高βリボ蛋白血症、高コレステロール血症、高トリグリセライド血症、低αリボ蛋白血症、移植、アテレクトミーおよび血管形成後再狭窄、細菌感染症等を始めとする各種疾患等の発症機構の解明、さらにその診断、予防および治療法、ならびにそれらのための試薬や医薬の開発に利用できる可能性がある。また、SRC L-P1に対する抗体を作製する際の抗原として用いることができる。さらに、アゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法にも利用できる

#### アゴニストおよびアンタゴニスト

本発明は、また、本発明のSRC L-P1の活性または活性化を刺激するアゴニストにも関する。本発明は、また、本発明のSRC L-P1の活性または活性化を阻害するアンタゴニストにも関する。アンタゴニストのスクリーニングは、例えば、SRC L-P1タンパク質を発現させた細胞に候補阻害剤とOxLDLまたは抗体を作用させる競合的実験系を用いることができ、OxLDLの結合割合から候補阻害剤をスクリーニングすることができる。その他、自体公知の方法により行うことができる。また、アンタゴニストにはSRC L-P1遺伝子の発現を阻害するアンチセンス核酸も含まれる。他のスクリーニング方法として、受容体の活性化によって生じる細胞外pHの変化を測定する方法 (Science, 246, 181-296, 1989) がある

25        こうしてスクリーニングしたアンタゴニストは、酸化LDL蓄積や、細胞へのAGEの結合に関わる病態について、治療、予防等の処置を行うための

薬物としても利用できる。そのスクリーニング方法は、本発明の SRC L-P 1 と酸化LDLまたはAGEとの結合量を、候補薬物の存在下および非存在下で比較し、この候補薬物が両者の結合を阻害する能力によって、目的とする病態を処置するための薬物を同定する工程を含むことを特徴とするものである。

#### トランスジェニック非ヒト動物

本発明は、SRC L-P 1 遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト動物に関する。ここで、SRC L-P 1 遺伝子とは、h SRC L-P 1 4 もしくは SRC L-P 1 をコードする c DNA、ゲノム DNA あるいは合成 DNA を含む。また、遺伝子の発現には転写と翻訳のいずれのステップも含まれる。本発明によるトランスジェニック非ヒト動物は、SRC L-P 1 の機能あるいは発現調節の研究、SRC L-P 1 が関与すると予想される疾患のメカニズム解明、医薬品のスクリーニング・安全性試験に用いる疾患モデル動物の開発に有用である。

本発明においては、遺伝子の発現を正常に調節しているいくつかの重要な部位（エンハンサー、プロモーター、イントロン等）の一部に欠失、置換、付加および／または挿入などの変異を起こさせることにより、本来の遺伝子の発現レベルと比較して上昇または下降するように人工的に修飾することができる。この変異の導入は、公知の方法により行うことができ、トランスジェニック動物を得ることができる。

トランスジェニック動物とは狭義には遺伝子組換えにより、外来遺伝子が生殖細胞に人為的に導入された動物のことをいい、広義にはアンチセンス RNA を用いて特定の遺伝子の機能を抑えたアンチセンス・トランスジェニック動物や、胚性幹細胞（ES細胞）を用いて特定の遺伝子をノックアウトした動物、点突然変異 DNA を導入した動物を含み、個体発生の初期に外来遺伝子が安定して染色体に導入され、その子孫に遺伝形質として

伝達され得る動物のことをいう。

本明細書中でいうトランスジェニック動物とはヒト以外のすべての脊椎動物を含む広義の意味に解する。本発明におけるトランスジェニック動物は、SRC L-P 1の機能あるいは発現調節の研究、ヒトにおいて発現している細胞に関連する疾患のメカニズムの解明、医薬品のスクリーニング・安全性試験に用いる疾患モデル動物の開発に有用である。

トランスジェニック動物の作製方法は、位相差顕微鏡下で前核期卵子の核に、微小ピペットで遺伝子を直接導入する方法（マイクロインジェクション法、米国特許第4873191号）、胚性幹細胞（ES細胞）を使用する方法などがある。その他、レトロウィルスベクターまたはアデノウィルスベクターに遺伝子を挿入し、卵子に感染させる方法、また、精子を介して遺伝子を卵子に導入する精子ベクター法等が開発されている。

精子ベクター法とは、精子に外来遺伝子を付着またはエレクトロポレーション等の方法で精子細胞内に取り込ませた後に、卵子に受精させることにより、外来遺伝子を導入する遺伝子組換え法である（M. Lavitrano et al., Cell, 57, 717, 1989）。あるいはバクテリオファージP1のcre/loxPリコンビナーゼ系やサッカロマイセス・セレビシアエ（*Saccharomyces cerevisiae*）のFLPリコンビナーゼ系等によるin vivoにおける部位特異的遺伝子組換えを用いることもできる。また、レトロウィルスを使用して、非ヒト動物へ目的タンパク質のトランスジーンを導入する方法も報告されている。

マイクロインジェクション法によるトランスジェニック動物作製方法は、例えば、以下に示すようにして行われる。

まず、発現制御に関わるプロモーター、特定のタンパク質をコードする遺伝子、ポリAシグナルから基本的に構成されるトランスジーンが必要である。プロモーター活性により特定分子の発現様式や発現量が左右され、

また、導入トランスジーンのコピー数や染色体上の導入部位により作製されたトランスジェニック動物が系統間で異なるため、各系統間で発現様式・発現量を確認する。非翻訳領域やスプライシングにより発現量が変化することが判明しているため、予めポリAシグナルの前にスプライシングされるイントロン配列を導入してもよい。受精卵に導入する遺伝子ではできるだけ純度の高いものを使用することが重要である。使用する動物としては、受精卵採取用マウス（5～6週齢）、交配用雄マウス、偽妊娠雌マウス、輸精管結紮雄マウス等が用いられる。

効率よく受精卵を得るために、ゴナドトロピン等により排卵を誘発してもよい。受精卵を回収し、マイクロインジェクション法にて卵子の雄性前核にインジェクションピペット中の遺伝子を注入する。注入した卵子を輸卵管に戻すための動物（偽妊娠雌マウス等）を用意し、一匹に対して約10～15個を移植する。その後、誕生したマウスにトランスジーンが導入されているか否かを、尾の先端部からゲノムDNAを抽出し、サザン法あるいはPCR法によりトランスジーンを検出するか、あるいは相同組換えが起こったときのみに活性化するマーカー遺伝子を挿入したポジティブクローニング法により確認することができる。さらに、トランスジーンが発現を確認するため、ノザン法もしくはRT-PCR法によりトランスジーン由来転写産物を検出する。または、タンパク質またはその断片に対する特異的抗体によって、ウェスタンブロッティングを行ってもよい。

#### ノックアウトマウス

本発明のノックアウトマウスは、SRC1遺伝子の機能が失われるように処理されたものである。ノックアウトマウスとは相同組換え技術により任意の遺伝子を破壊し、機能を欠損させたトランスジェニックマウスをいう。ES細胞を用いて相同組換えを行い、一方の対立遺伝子を改変・破壊した胚性幹細胞を選別し、ノックアウトマウスを作製することがで

きる。例えば、受精卵の胚盤胞や桑実胚期に遺伝子进行操作した胚性幹細胞を注入して、胚性幹細胞由来の細胞と胚由来の細胞が混ざったキメラマウスを得る。このキメラマウス（キメラとは、2個以上の受精卵に基づいた体細胞で形成される単一個体をいう）と正常マウスを交配すると、一方の対立遺伝子の全てが改変・破壊されたヘテロ接合体マウスを作製することができる。さらに、ヘテロ接合体マウス同士を交配することで、ホモ接合体マウスが作製できる。

相同組換えとは、遺伝子組換え機構で塩基配列が同じ、または非常に類似している2つの遺伝子間で起こる組換えのことをいう。相同組換えを起こした細胞の選別にはPCRを使用することができる。挿入遺伝子の一部と挿入が期待される領域の一部をプライマーとして用いるPCR反応を行い、増幅産物ができた細胞で相同組換えを起こしていることが判明できる。また、胚幹細胞で発現している遺伝子に相同組み換えを起こさせる場合には、導入遺伝子にネオマイシン耐性遺伝子を結合させておき、導入後に細胞をネオマイシン耐性にさせることにより選択することができる等、公知の方法およびそれらの変法を用いて容易に選択することができる。

#### 抗体の作製方法

本発明はまた、SRC L-P 1またはその断片を認識する抗体を提供する。本発明の抗体には例えば、配列番号2または4のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するタンパク質またはその断片に対する抗体が含まれる。SRC L-P 1またはその断片に対する抗体（例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ペプチド抗体）または抗血清は、本発明のSRC L-P 1またはその断片等を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。特に、SRC L-P 1の機能を制御できる抗体（例えばCRD、コラーゲン様ドメインおよび $\alpha$ -helical coiled coilドメイン等を認識する抗体）は抗体含有医薬品として有用



である。

本発明のSRCLEP1またはその断片は、投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体または希釈剤、担体と共に温血動物に対して投与される。投与に際して抗体産生を高めるために、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与しても良い。投与は通常1～6週毎に1回づつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えばサル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ等が挙げられるが、マウスおよびラットが好ましくは用いられる。ラットにはWistarおよびSD系ラット等が好ましく、マウスにはBALB/c、C57BL/6およびICR系マウス等が好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められる個体を選択し、最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば後記の標識化SRCLEP1と抗血清とを反応させた後、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、例えばケーラーとミルスタインの方法(Nature, 256, 495, 1975)やその変法(J. Immunol. Method, 39, 285, 1980; Eur. J. Biochem., 118, 437, 1981; Nature, 285, 446, 1980)に従い実施できる。融合促進剤としてはポリエチレングリコール(PEG)やセンダイウィルス等が挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。さらに融合効率を高めるために、適宜レクチン、ポリーラージンもしくはDMSOを添加することもできる。

骨髓腫細胞としては、例えばX-63Ag8、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1等が挙げられるが、好ましくはSP2/0が用いられ

る。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1 : 20 ~ 20 : 1であり、PEG（好ましくはPEG 1000 ~ PEG 6000）を10 ~ 80 %程度の濃度で添加し、20 ~ 40 °C、好ましくは30 ~ 37 °Cで1 ~ 10 分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。抗SRCL-P1抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、SRCL-P1抗原を直接または担体と共に吸着させた固相（例えば、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合した抗SRCL-P1抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素等で標識したSRCL-P1を加え、固相に結合した抗SRCL-P1モノクローナル抗体を検出する方法等が挙げられる。

抗SRCL-P1モノクローナル抗体の選別およびクローニングは、自体公知またはそれに準じる方法に従って行うことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行われる。選別、クローニングおよび育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1 ~ 20 %、好ましくは10 ~ 20 %の牛胎児血清を含むRPMI培地、1 ~ 10 %の牛胎児血清を含むGIT培地、またはハイブリドーマ培養用無血清培地等を用いることができる。培養温度は、好ましくは約37 °Cである。培養時間は、通常5日 ~ 3週間、好ましくは1週間 ~ 2週間である。培養は、通常5 %炭酸ガス下で行われる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗SRCL-P1抗体価の測定と同様にして測定

できる。すなわち、測定方法としてはラジオイムノアッセイ（RIA）法、酵素免疫測定法（ELISA）法、FIA（蛍光イムノアッセイ）法、ブランク測定法、凝集反応法等を用いることができるが、以下に示すようなELISA法が好ましい。

- 5        ELISA法によるスクリーニングは以下の方法に準じて行うことができる。免疫抗原と同様の操作で調製したタンパク質をELISAプレート
- 10        の各ウェルの表面に固定化する。次に、非特異的吸着を防止する目的で、BSA、MSA、OVA、KLH、ゼラチンもしくはスキムミルク等を各ウェルに固定化する。この各ウェルにハイブリドーマ培養上清液を添加し
- 15        、一定時間放置し免疫反応を行わせる。PBS等を洗浄液として各ウェルを洗浄する。この洗浄液中には界面活性剤を添加することが好ましい。酵素標識二次抗体を添加し一定時間放置する。標識酵素としては、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼ等を用いることができる。同じ洗浄液で各ウェルを洗浄後、使用した標識酵素の基質
- 20        溶液を添加し酵素反応を行わせる。添加したハイブリドーマ培養上清液中に目的とする抗体が存在する場合は酵素反応が進行し基質溶液の色が変化する。

- 25        クローニングは、通常半固体アガー法や限界希釈法等のそれ自体公知の方法で行うことができ、具体的には前記の方法で目的とする抗体を産生するウェルを確認した後、クローニングを行いシングルクローンを得る。クローニング法としては、培養プレート1ウェルあたりに1個のコロニーが形成するようにハイブリドーマ細胞を希釈して培養する限界希釈法等を用いると良い。限界希釈法によるクローニングには、コロニー形成能と高めるために支持細胞を用いるか、インターロイキン6などの細胞増殖因子を
- 30        添加しても良い。その他、FACSおよびシングルセルマニピレーション法を用いてクローニングすることができる。クローン化されたハイブリド

ーマを、好ましくは無血清培地中で培養し、至適量の抗体をその上清に加える。この様にして得られた単一のハイブリドーマは、フラスコや細胞培養装置を用いて大量培養を行うか、動物の腹腔内で培養する (J. Immunol. Meth., 53, 313, 1982) ことにより、モノクローナル抗体を得ることができる。フラスコ内で培養を行う場合は、0～20%のFCSを含む細胞培養用培地 (IMDM、DMEM、RPMI 1640およびMEM等) を用いて行うことができる。動物の腹腔内で培養する場合は、細胞融合に使用した骨髓腫細胞の由来となった動物と同種、同系統の動物または胸腺欠損ヌードマウス等を使用することが好ましく、予めプリスタン等の鉱物油を投与してからハイブリドーマを移植する。1～2週間後腹腔内に骨髓腫細胞が増殖し、モノクローナル抗体を含む腹水を得ることができる。

本発明によるモノクローナル抗体は、SRC L-P 1に特異的なエピトープを認識するものを選択することによって、他のタンパク質と交差しないものとすることができる。一般的にそのタンパク質を構成するアミノ酸配列の中から、連続する少なくとも5以上のアミノ酸残基、望ましくは7～20アミノ酸のアミノ酸配列によって提示されるエピトープは、そのタンパク質に固有のエピトープを示すと言われている。従って、配列番号2および4のいずれかに記載されたアミノ酸から選択され、かつ連続する少なくとも5アミノ酸残基から成るアミノ酸配列を持つペプチドによって構成されるエピトープを認識するモノクローナル抗体は、本発明におけるh SRC L-P 1もしくはm SRC L-P 1特異的なモノクローナル抗体といえる。配列番号2および4に記載されたアミノ酸配列の間で保存されたアミノ酸配列を選べば、SRC L-P 1に共通のエピトープを選択することができる。あるいは各配列に特異的なアミノ酸配列を含む領域であれば、それぞれのタンパク質の識別が可能なモノクローナル抗体を選択することができる。

## 35

抗S R C L - P 1モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法に従って行うことができる。公知の精製法としては、例えば、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、硫酸沈殿法、イオン交換体（例えばD E A E）による吸脱着法、超遠心法、ゲル濾過法、抗原結合固相またはプロテインAもしくはプロテインG等の活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法のような手法を施すことができる。精製過程において凝集物の形成や抗体価の低下を防止する目的で、例えばヒト血清アルブミンを0.05～2%の濃度で添加する。その他、グリシン、 $\alpha$ -アラニン等のアミノ酸類、特にリジン、アルギニンおよびヒスチジン等の塩基性アミノ酸、グルコースやマンニトール等の糖類または塩化ナトリウム等の塩類を添加しても良い。1 g M抗体の場合、特に凝集しやすいことが知られているため、 $\beta$ -プロピオラクトンおよび無水酢酸で処理しても良い。

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質抗原）自体、あるいはそれとキャリアタンパク質との複合体を作り、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行い、該免疫動物から本発明のタンパク質またはその断片に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行うことにより製造することができる。温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアタンパク質との複合体に関し、キャリアタンパク質の種類およびキャリアとハプテンとの混合比は、キャリアに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率よくできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させても良いが、例えばウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカップリングさ

せる方法が用いられる。また、ハプテンとキャリアーのカップリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬などが用いられる。縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤と共に投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与しても良い。投与は、通常2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行われる。ポリクローナル抗体は上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水等、好ましくは血液から採取することができる。抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行うことができる。

#### 抗体の利用方法

S R C L - P 1 またはその断片に対するモノクローナル抗体ならびにポリクローナル抗体は、S R C L - P 1 を発現している細胞に関連する疾病の診断や治療に利用することが可能である。これらの抗体を用いて、本発明のS R C L - P 1 またはその断片との免疫学的な結合に基づき、S R C L - P 1 またはその断片を測定することができる。具体的にこれらの抗体を用いてS R C L - P 1 またはその断片を測定する方法としては、例えば、不溶性担体に結合させた抗体と標識化抗体とによりS R C L - P 1 またはその断片を反応させて生成したサンドイッチ錯体を検出するサンドイッチ法、また、標識化S R C L - P 1 と検体中のS R C L - P 1 またはその断片を抗体と競合的に反応させ、抗体と反応した標識抗原量から検体中のS R C L - P 1 またはその断片を測定する競合法を利用して検体中のS R C L - P 1 またはその断片を測定する方法が挙げられる。

5      サンドイッチ法によるSRCL-P1またはその断片の測定においては、まず、固定化抗体とSRCL-P1またはその断片とを反応させた後、未反応物を洗浄によって完全に除去し、標識化抗体を添加して固定化抗体-SRCL-P1標識化抗体を形成させる2ステップ法もしくは固定化抗体、標識化抗体およびSRCL-P1またはその断片を同時に混合する1

10      ステップ法などを用いることができる。

測定に使用される不溶性担体は、例えばポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリアクリル酸エステル、ナイロン、ポリアセタール、フッ素樹脂等の合成樹脂、セルロース、

10      アガロース等の多糖類、ガラス、金属等が挙げられる。不溶性担体の形状としては、例えばトレイ状、球状、繊維状、棒状、盤状、容器状、セル、試験管等の種々の形状を用いることができる。抗体を吸着した担体は、適宜アジ化ナトリウム等の防腐剤の存在下、冷所に保存する。

15      抗体の固層化には、公知の化学的結合法または物理的吸着法を用いることができる。化学的結合法としては例えばグルタルアルデヒドを用いる方法、N-スクシニイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサ

20      ン-1-カルボキシレートおよびN-スクシニイミジル-2-マレイミドアセテートなどを用いるマレイミド法、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸などを用いるカルボジイミド法が挙げられる。その他、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシサクシニミド

25      エステル法、N-サクシミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸法、ビスジアゾ化ベンジジン法、ジバルミチルリジン法が挙げられる。あるいは、先に被検出物質とエピトープの異なる2種類の抗体を反応させて形成させた複合体を、抗体に対する第3の抗体を上記の方法で固層化させておいて捕捉することも可能である。

標識物質としては、酵素、蛍光物質、発光物質、放射性物質および金属

キレート等を使用するのが好ましい。酵素としては、例えばペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルター-5-ステロイドイソメラーゼ、 $\alpha$ -グリセロールホスフェートデヒドロゲナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、西洋わさびパーオキシダーゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ等が挙げられ、蛍光物質としては、例えばフルオレセインイソチアネート、フィコビリプロテイン、ローダミン、  
10 フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、オルトフタルアルデヒド等が挙げられ、発光物質としてはイソルミノール、ルシゲニン、ルミノール、芳香族アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩およびその修飾エステル、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、エクオリン等が挙げられ、放射性物質としては $^{125}\text{I}$ 、 $^{127}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 等が挙げられるが、これらに限らず免疫学的測定法に  
15 使用することができるものであれば特に限定されない。さらに、抗体にビオチン、ジニトロフェニル、ピリドキサールまたはフルオレサミンの様な低分子ハフテンを結合させても良い。好ましくは西洋わさびペルオキシダーゼを標識化酵素として用いる。本酵素は多くの基質と反応することができ、過ヨウ素酸法によって容易に抗体に結合させることができる。

標識化剤が酵素である場合には、その活性を測定するために基質、必要により発色剤を用いる。酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合には、基質溶液として $\text{H}_2\text{O}_2$ を用い、発色剤として2, 2'-アジノージー [3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸] アンモニウム塩 (ABTS)、  
25 5-アミノサリチル酸、オルトフェニレンジアミン、4-アミノアンチピリン、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン等を使用することが



でき、酵素にアルカリフォスファターゼを用いる場合は基質としてオルト  
ニトロフェニルフォスフェート、パラニトロフェニルリン酸等を使用する  
ことができ、酵素に $\beta$ -D-ガラクトシダーゼを用いる場合は基質として  
フルオレセインージ（ $\beta$ -D-ガラクトピラノシド）、4-メチルウン  
5 ベリフェニル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド等を使用することができる。  
本発明には、また、前述のモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体およ  
び試薬類をキット化したものも含まれる。

架橋剤としては、N, N'-オルトフェニレンジマレイミド、4-(N  
-マレイミドメチル)シクロヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、  
10 6-マレイミドヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、4, 4'-ジ  
チオピリジン、その他公知の架橋剤が利用可能である。これらの架橋剤と  
酵素および抗体との反応は、それぞれの架橋剤の性質に応じて既知の方法  
に従って行えばよい。また、抗体としては、場合によっては、そのフラグ  
メント、例えばF'a b'、F a b、F (a b')<sub>2</sub>を用いる。また、ポリ  
15 クローナル抗体、モノクローナル抗体にかかわらず同様の処理により酵素  
標識体を得ることができる。上記架橋剤を用いて得られる酵素標識体をア  
フィニティークロマトグラフィー等の公知の方法にて精製すれば、更に感  
度の高い免疫測定系が可能となる。精製した酵素標識化抗体は、安定剤と  
してチメロサルもしくはグリセリン等を加えて、あるいは凍結乾燥して  
20 冷暗所に保存する。

測定対象は、血漿、血清、血液、尿、組織液、脳脊髄液等の体液、各種  
細胞、組織等、SRCL-P1を含む試料であれば限定されない。

#### ヒト化抗体の作製方法

ヒトに任意の抗原を免疫して抗体を製造することは倫理上不可能である  
25 。また、マウスモノクローナル抗体をヒトの体内に投与すると、ヒトにと  
っては異種タンパクであるので種々の副作用が起こる危険性がある。そこ

で、ヒトに抗体を投与する場合にはヒトに対し抗原性を低くした抗体が好ましい。

ヒトモノクローナル抗体の作製方法には細胞融合法以外にも、エプスタイン・バール (Epstein-Barr) ウィルス (EBV) で形質転換する方法、さらにはその形質転換した細胞を親細胞と融合させる方法、遺伝子工学を利用しキメラ抗体、ヒト化抗体を作製する方法などがある。キメラ抗体とは異種の動物の免疫グロブリン遺伝子断片をつなげて作製された抗体であり、ヒト化抗体とはマウスなどにヒトにとって異種の抗体を改変して、H鎖とL鎖の相補性決定部 (CDR) 以外の一次構造をヒトの抗体の対応する一次構造に置換した抗体をいう。

キメラ抗体の作製方法として、まずマウスに免疫し、そのマウスモノクローナル抗体の遺伝子から抗原と結合する抗体可変部 (V領域) を切り出し、ヒト骨髓腫由来の抗体定常部 (C領域) 遺伝子と結合してキメラ遺伝子を作製する。このキメラ遺伝子を宿主細胞で発現させれば、ヒト・マウス・モノクローナル抗体が産生できる。キメラ抗体はヒトに対する抗原性が少ないため、ヒト体内に投与する治療用や画像診断用モノクローナル抗体等として利用できる。公知のキメラ抗体の関連技術として、特開平05-304989号、特開平04-330295号、W09106649、特開昭63-036786号、特公平06-98021号等がある。

また、最近キメラ抗体よりも有用であるといわれるヒト化抗体が開発された。ヒト化抗体とは抗体分子の抗原結合部位 (CDR: Complementary determining region、相補性決定領域) の遺伝子配列のみをヒト抗体遺伝子に移植 (CDRグラフトイング) し、抗体分子のCDRを除いた全分子をヒト化した抗体である。本抗体はヒト・マウス・キメラ抗体より、マウスの抗体部分が少ないため、抗原性が少なく安全性が高いと言われている。ヒトモノクローナル抗体作製の親細胞は、ヒト/マウスのヘテロミエローマ

であるSHM-D 33株 (ATCC CRL 1668) またはRF-S1株を用いるとマウスの親細胞と同等の高い融合効率が得られる。これらの親細胞を用いて得られたハイブリドーマはフィーダー細胞なしでクローニングが可能であり、IgGタイプの抗体を比較的安定にしかも大量に産生することができる。親細胞の培養には、15%FCSを加えたERDF培地を用い、その他の操作はマウスの場合と同様である。また、IgGタイプのヒトモノクローナル抗体を作製するには抗原で十分に感作されたヒトリンパ球を末梢血から採取して用いるのが好ましい。十分に抗原で感作されたリンパ球の取得が困難な場合には *in vitro* で抗原感作を行うこともできる。我が国では現在、成人性T細胞白血病に対するヒト化抗体の臨床試験が行われている。ヒト化抗体の製造方法およびその関連技術については、例えば、米国Genentech社 (W09222653、W09845332、W09404679、W09837200、W09404679、) および英国Celltech社 (W09429451、W09429351、W09413805、W09306231、W09201059、W09116927、W09116928、W09109967、W08901974、W08901783) 等に関連した技術を利用することができる。

上記示した方法等を用いることにより、本発明の抗体をヒト化することができ、ヒトに投与する場合には非常に有用である。

#### 組成物

S R C L - P 1 ポリヌクレオチドまたはタンパク質、および抗体物質、そしてS R C L - P 1 のアンタゴニスト等は、酸化LDL (変性LDL) 蓄積に関わる病態、例えば、アテローム性動脈硬化症等の動脈硬化をはじめ、細胞へのAGEの結合に関わる糸球体硬化症などの障害、糖尿病性合併症およびAD、高 $\beta$ リボ蛋白血症、高コレステロール血症、高トリグリセライド血症、低 $\alpha$ リボ蛋白血症、移植、アテレクトミーおよび血管形成後再狭窄、細菌感染症等を始めとする各種疾患等の診断、予防および治療法、ならびにそれらのための試薬や医薬の開発に利用できる可能性がある。また、こ

れら公知の医薬との併用または配合もできる。例えば、アテローム性動脈硬化症の治療薬、例えば、ACATインヒビター、HMG-CoA還元酵素阻害剤、脂質調節剤、胆汁酸調節剤と併用または配合することができる。

本発明の医薬組成物はSRCL-P1ポリヌクレオチドおよびタンパク質、SRCL-P1タンパク質の活性または活性化を刺激する物質または阻害する物質、SRCL-P1タンパク質に対する抗体等の物質（以下、SRCL-P1関連物質）が含まれる。SRCL-P1関連物質は、そのままあるいは水に希釈する等の各種処理を施して使用することができるが、医薬品、医薬部外品等に配合して使用することができる。この場合、該物質の配合量は製品に応じて適宜選択されるところではあるが、通常全身投与製剤の場合には、0.001～50重量%、特に0.01～10重量%とすることができ、0.001%より少ないと満足する涙液分泌促進作用が認められない可能性があり、また、50%を越えると製品そのものの安定性や香味等の特性が損なわれる可能性がある。

投与経路は前記示した経口投与および静脈内投与以外に、経粘膜投与、経皮投与、筋肉内投与、皮下投与、直腸内投与、眼局所投与等が適宜選択できる。

本発明のSRCL-P1関連物質は塩として製剤中に含有されていてもよい。薬剤学的に許容される塩としては、例えば無機塩基、有機塩基等の塩基との塩、無機酸、有機酸、塩基性または酸性アミノ酸などの酸付加塩等が挙げられる。無機塩基としては、例えば、ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属、カルシウム、マグネシウム等のアルカリ土類金属、アルミニウム、アンモニウム等が挙げられる。有機塩基としては、例えば、エタノールアミン等の第一級アミン、ジエチルアミン、ジエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミン、N,N'-ジベンジルエチレンジアミン等の第二級アミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、ト

## 43

リエタノールアミン等の第三級アミン等が挙げられる。無機酸としては、例えば、塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸等が挙げられる。有機酸としては、例えば、ギ酸、酢酸、乳酸、トリフルオロ酢酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、安息香酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸等が挙げられる。塩基性アミノ酸としては、例えば、アルギニン、リジン、オルニチン等が挙げられる。酸性アミノ酸としては、例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸等が挙げられる。

経口投与を行う場合の剤型として、散剤、顆粒剤、カプセル剤、丸剤、錠剤、エリキシル剤、懸濁剤、乳剤およびシロップ剤等があり、適宜選択することができる。また、それら製剤について徐放化、安定化、易崩壊化、難崩壊化、腸溶性化、易吸収化等の修飾を施すことができる。また、口腔内局所投与を行う場合の剤型として、咀嚼剤、舌下剤、バツカル剤、トローチ剤、軟膏剤、貼布剤、液剤等があり、適宜選択することができる。また、それら製剤について徐放化、安定化、易崩壊化、難崩壊化、腸溶性化、易吸収化等の修飾を施すことができる。

前記示した剤型について、公知のドラッグデリバリーシステム（DDS）の技術を採用することができる。本明細書に言うDDS製剤とは、除法化製剤、局所適用製剤（トローチ、バツカル錠、舌下錠等）、薬物放出制御製剤、腸溶性製剤および胃溶性製剤等、投与経路、バイオアベイラビリティ、副作用等を勘案した上で、最適の製剤形態にした製剤を言う。

DDSの構成要素には基本的に薬物、薬物放出モジュール、おいおよび治療プログラムから成り、各々の構成要素について、特に放出を停止させた時に速やかに血中濃度が低下する半減期の短い薬物が好ましく、投与部位の生体組織と反応しないおいが好ましく、さらに、設定された期間において最良の薬物濃度を維持する治療プログラムを有するのが好ましい。

薬物放出モジュールは基本的に薬物貯蔵庫、放出制御部、エネルギー源および放出孔または放出表面を有している。これら基本的構成要素は全て揃っている必要はなく、適宜追加あるいは削除等を行い、最良の形態を選択することができる。

- 5        DDSに使用できる材料としては、高分子、シクロデキストリン誘導体、レシチン等がある。高分子には不溶性高分子（シリコーン、エチレン・酢酸ビニル共重合体、エチレン・ビニルアルコール共重合体、エチルセルロース、セルロースアセテート等）、水溶性高分子およびヒドロキシルゲル形成高分子（ポリアクリルアミド、ポリヒドロキシエチルメタクリレート
- 10        架橋体、ポリアクリル架橋体、ポリビニルアルコール、ポリエチレンオキシド、水溶性セルロース誘導体、架橋ボロキサマー、キチン、キトサン等）、徐溶解性高分子（エチルセルロース、メチルビニルエーテル・無水マレイン酸共重合体の部分エステル等）、胃溶性高分子（ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルメコースナトリウム、マクロゴール、ポリビニルピロリドン、メタアクリル酸ジメチル
- 15        アミノエチル・メタアクリル酸メチルコポリマー等）、腸溶性高分子（ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、酢酸フタルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートサクシネート、カルボキシメチルエチルセルロース、アクリル酸系ポリマー等）、生分解性高分子
- 20        （熱凝固または架橋アルブミン、架橋ゼラチン、コラーゲン、フィブリン、ポリシアノアクリレート、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、ポリ $\beta$ ヒドロキシ酢酸、ポリカプロラクトン等）があり、剤型によって適宜選択することができる。

- 25        特に、シリコーン、エチレン・酢酸ビニル共重合体、エチレン・ビニルアルコール共重合体、メチルビニルエーテル・無水マレイン酸共重合体の部分エステルは薬物の放出制御に使用でき、セルロースアセテートは浸

透圧ポンプの材料として使用でき、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロースは徐放性製剤の膜素材として使用でき、ポリアクリル架橋体は口腔粘膜あるいは眼粘膜付着剤として使用できる。

- 5       また、製剤中にはその剤形（経口投与剤、注射剤、座剤等の公知の剤形）に応じて、溶剤、賦形剤、コーティング剤、基剤、結合剤、滑沢剤、崩壊剤、溶解補助剤、懸濁化剤、粘稠剤、乳化剤、安定剤、緩衝剤、等張化剤、無痛化剤、保存剤、矯味剤、芳香剤、着色剤等の添加剤を加えて製造することができる。

- 10       それぞれ具体例を挙げて例示するが、本願発明はこれらに特に限定されるものではない。

- 〔溶剤〕精製水、注射用水、生理食塩水、ラッカセイ油、エタノール、グリセリン、〔賦形剤〕デンプン類、乳糖、ブドウ糖、白糖、結晶セルロース、硫酸カルシウム、炭酸カルシウム、タルク、酸化チタン、トレハロース、キシリトール、〔コーティング剤〕白糖、ゼラチン、酢酸フタル酸セルロースおよび上記記載した高分子、〔基剤〕ワセリン、植物油、マクロゴール、水中油型乳剤性基剤、油中水型乳剤性基剤、〔結合剤〕デンプンおよびその誘導体、セルロースおよびその誘導体、ゼラチン、アルギン酸ナトリウム、トラガント、アラビアゴム等の天然高分子化合物、ポリビニルピロリドン等の合成高分子化合物、デキストリン、ヒドロキシプロピルスターチ、〔滑沢剤〕ステアリン酸およびその塩類、タルク、ワックス類、コムギデンプン、マクロゴール、水素添加植物油、ショ糖脂肪酸エステル、ポリエチレングリコール、〔崩壊剤〕デンプンおよびその誘導体、寒天、ゼラチン末、炭酸水素ナトリウム、セルロースおよびその誘導体、カルメロースカルシウム、ヒドロキシプロピルスターチ、カルボキシメチルセルロースおよびその塩類ならびにその架橋体、低置換型ヒドロキシプロ
- 15
- 20
- 25

ビルセルロース、〔溶解補助剤〕シクロデキストリン、エタノール、プロ  
ピレングリコール、ポリエチレングリコール、〔懸濁化剤〕アラビアゴム  
、トラガント、アルギン酸ナトリウム、モノステアリン酸アルミニウム、  
クエン酸、各種界面活性剤、〔粘稠剤〕カルメロースナトリウム、ポリビ  
5 ニルピロリドン、メチルセルロース、ホドロキシプロピルメチルセルロー  
ス、ポリビニルアルコール、トラガント、アラビアゴム、アルギン酸ナト  
リウム、〔乳化剤〕アラビアゴム、コレステロール、トラガント、メチル  
セルロース、各種界面活性剤、レシチン、〔安定剤〕亜硫酸水素ナトリウ  
ム、アスコルビン酸、トコフェロール、キレート剤、不活性ガス、還元性  
10 物質、〔緩衝剤〕リン酸水素ナトリウム、酢酸ナトリウム、ホウ酸、〔等  
張化剤〕塩化ナトリウム、ブドウ糖、〔無痛化剤〕塩酸プロカイン、リド  
カイン、ベンジルアルコール、〔保存剤〕安息香酸およびその塩類、パラ  
オキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、逆性石けん、ベンジルア  
ルコール、フェノール、チロメサール、〔矯味剤〕白糖、サッカリン、カ  
15 ンゾウエキス、ソルビトール、キシリトール、グリセリン、〔芳香剤〕ト  
ウヒチンキ、ローズ油、〔着色剤〕水溶性食用色素、レーキ色素。

#### 〔実施例〕

以下に、本発明の新規スカベンジャーレセプターに関して、実施例に沿  
って詳細に説明するが、これら実施例の開示によって、本発明が限定的に  
20 解釈されるべきでないことは勿論である。

すなわち、ESTデータベースの検索（実施例1）、スクリーニング用ブ  
ローブの作製（実施例2）、ヒト胎盤由来cDNAライブラリーのスクリーニ  
ング（実施例3）、新規ヒトスカベンジャーレセプターの塩基配列の決定  
（実施例4）、ならびに新規マウススカベンジャーレセプターのcDNAの取  
25 得（実施例5）、さらに、新規ヒトスカベンジャーレセプターを一過性に  
発現するトランスフェクタントの作製方法（実施例6および7）、新規ヒ



トスカベンジャーレセプターを安定に発現するトランスフェクタントの作製方法（実施例 8 および 9）、新規ヒトスカベンジャーレセプターの結合特異性の検証（実施例 10）、貪食能の証明（実施例 11）、そして血管内皮細胞での発現の証明（実施例 12）を例証したので以下に説明する。

5        実施例 1 : EST データベースの検索

既知のコレクチンすなわち、ヒト MBP、ヒト SP-A および ヒト SP-D のアミノ酸配列（図 2 および 3 参照、図中、相同と認められるアミノ酸残基部分に囲みを付した）を比較することにより、分子間に保存性の高い領域の検索を行った。この結果、ヒト MBP のアミノ酸配列における第 220 番目から  
10        246 番目までの 27 アミノ酸（図 3、白抜文字部分、配列番号 5）に保存性が高いことが明かとなったので、この領域に相当するコンセンサス配列をいくつか作成し、EST（Expressed Sequence Tags）データベースの検索を行った。EST データベースは、1996 年 10 月 11 日に、676750 件の配列を含むものを使用した。

15        その結果、上記 27 アミノ酸の配列と相同性の高いアミノ酸配列を含むデータがいくつか得られた。得られたデータのアミノ酸配列について GenBank/EST データベースの検索を行い、既知または未知物質のいずれであるかを判定した結果、コンセンサス配列として、

20        Glu-Lys-Cys-Val-Glu-Met-Tyr-Thr-Asp-Gly-Lys-Trp-Asn-Asp-Arg-Asn-Cys-Leu-Gln-Ser-Arg-Leu-Ala-Ile-Cys-Glu-Phe（配列番号 6）で示されるアミノ酸配列を用いて検索したときに得られたデータの中に、相同性は高いが未知の塩基配列を含む 2 種のデータ（登録番号：W72977 および R74387）を得ることができた。これらは、それぞれ、胎盤由来および胎児心臓由来であり、新規コレクチンの塩基配列の一部を示すクローンであった

---        そこで、このうち、胎児心臓由来のクローン（I. M. A. G. E. Consortiu

m Clone ID 34472) をATCC (American Type Culture Collection) より購入して、以下の新規スカベンジャーレセプター取得のためのスクリーニング用プローブ作製に利用した。

#### 実施例 2 : スクリーニング用プローブの作製

5        上記クローンのインサートDNAの塩基配列を、プライマー (ファルマシア社製、M13 Universal Primer (配列番号 7、5'-フルオレセイン-cgacgttgtaaaacgacggccagt-3') およびM13 Reverse Primer (配列番号 8、5'-フルオレセイン-caggaaacagctatgac-3')) で決定した。

10        この塩基配列から読取枠をコレクチンのアミノ酸配列に合わせて、そこから読み取ることができるアミノ酸配列に相当する塩基配列を抽出し、この一部分に相当するジゴキシゲニン (DIG) ラベルcDNAプローブ用プライマー (Reverse プライマー、caatctgatgagaaggtgatg (配列番号 9) およびForward プライマー、acgaggggctggatgggacat (配列番号 10) を、アブライドバイオシステムズ社製392A DNA/RNAシンセサイザーを用いて作製  
15        した。DIGラベルは、PCR DIGプローブ合成キット (ベーリンガー・マンハイム社製) を用いて行った。反応組成は以下のとおりである (プラスミドDNA (クローンW72977、50 ng/ $\mu$ l) : 2  $\mu$ l (100 ng)、10 x 緩衝液:  
5  $\mu$ l、25 mM MgCl<sub>2</sub> : 5  $\mu$ l、dNTP (PCRラベリングミックス) : 5  $\mu$ l、  
20  $\mu$ M Reverseプライマー : 2.5  $\mu$ l、20  $\mu$ M Forward プライマー : 5  $\mu$   
20        l、H<sub>2</sub>O : 28  $\mu$ l、Taq ポリメラーゼ : 0.5  $\mu$ l)。PCR反応は、アトー社製ザイモリアクターを用いて、92°C 1 分、55°C 1 分、72°C 2 分のサイクルを35回行った。

#### 実施例 3 : ヒト胎盤由来cDNAライブラリーのスクリーニング

25        先ず、以下のようにヒト胎盤由来ファージcDNAライブラリーのタイトレーションを行った。mLB培地 (10 mM MgSO<sub>4</sub>および0.2%マルトースを含むLB培地 (1 gトリプトン、0.5 gイーストエキストラクト、0.5 g NaCl

49

/100 ml) で37℃にて16時間培養したEscherichia coli Y1090r- 0.2 ml  
と、SM 緩衝液 (5.8 g NaCl、2 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、2 M Tris-HCl (pH 7.5)  
) 25 ml、5 ml 2%ゼラチン/L) で段階希釈したcDNAライブラリー0.1  
mlを37℃15分インキュベートし、その後2.5 mlのLB-TOP アガロース (0  
5 .75%アガロース/LB培地) に加え均一とし、90mmφ LB培地プレート (岩城  
硝子社製) (1.5%アガー/LB培地) にまいた。15分間室温で固化させ、  
42℃にて5時間インキュベーションした。各プレートのブラックを計数後  
、ファージのタイターを計算により求めた。その結果、タイターは2.1  
x 10<sup>10</sup> pfu/mlであった。このようにタイトレーションを行ったcDNAラ  
イブラリーにつき、実施例2で作製したプローブを用いて以下の通りにス  
10 クリーニングを行った。

mLB培地で37℃にて16時間培養したEscherichia coli Y1090r- 0.6ml  
とSM 緩衝液で希釈したcDNAライブラリー1 x 10<sup>10</sup> pfuを、37℃にて15分  
間インキュベートし、その後7.5 ml LB-TOP アガロース (0.75%アガロ  
15 ス) に加えて均一とした。これを140 mm<sup>2</sup>のLB培地角プレート (日水製薬  
社製) にまいたものを10枚作製し、15分間室温で固化させ、42℃にて5  
時間インキュベーションした。ブラック形成を確認後、次に、ナイロンメ  
ンブレンへの転写を行った。転写は、ナイトラン (Nytran) 13N (シュラ  
イヒャーアンドシュウェル社製 (Schleicher and Schuell Co.)) を用い  
て行った。12.5 cm x 9.0 cmのフィルターを蒸留水に浸けて10分間湿らせ  
20 た後、ワットマン3MM紙上において余分な水分を除去し、ブラックを形成  
したプレート上にフィルターを置いた。2分間放置した後、フィルターを  
剥がし、10分間風乾させた。0.2 M NaOH/1.5 M NaClにより2分間ファ  
ージDNAを変性させ、0.4 M Tris-HCl (pH7.6) / 2 x SSCで2分間中和し、  
25 2 x SSCで2分間洗浄を行った。その後、GS GENE LINKER (バイオラッド  
社製) で紫外線照射することによりファージDNAをメンブレンに固定した

## 50

。ハイブリダイゼーションおよびシグナルの検出は以下の様に行った。フィルターを2 x SSCで湿らせ、余分な水分をワットマン3MM紙で除去し、ハイブリダイゼーションバックに移しハイブリダイゼーション溶液 (5 x SSC、1%ブロッキング剤、0.1% N-ラウロイルサルコシン、0.02% SDS) と68℃にて1時間プレハイブリダイゼーションを行った。続いて、バックからハイブリダイゼーション溶液を除き、そこへDIGでラベルしたcDNAプローブを10 ng/mlになるように調製したハイブリダイゼーション溶液を加え、55℃にて16時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション終了後、フィルターは室温にて2 x SSC/0.1%SDS溶液で5分間、2回洗浄し、55℃にて、0.5 x SSC/0.1%SDS溶液で15分間2回洗浄した。次にDIG緩衝液 I (100 mM Tris-HCl、150 mM NaCl (pH7.5)) で1分間、SDSを除去し、DIG緩衝液II (1%ブロッキング剤、DIG緩衝液 I) で30分間、フィルターのブロッキングを行った。DIG緩衝液 I で1分間洗浄し、次いでDIG緩衝液IIで抗DIGアルカリフォスファターゼ標識抗体 (ベーリンガー・マンハイム社製) を5000倍希釈した溶液を加えて、30分間抗体反応を室温で行った後、室温でDIG緩衝液 I で15分間2回洗浄した。DIG緩衝液 III (100 mM Tris-HCl、100 mM NaCl (pH 9.5)、50 mM MgCl<sub>2</sub>) で3分間処理することによりMg<sup>2+</sup>の濃度を高め、NBT/BCIP (和光純薬社製) をDIG緩衝液IIIに加えた溶液で発色させたところ、10個の陽性クローンが得られた。これらのクローンに相当するブランクをプレートから切り出し、SM緩衝液1 mlを入れたチューブに加え、10分間攪拌した後SM緩衝液で段階希釈し、この希釈液0.1 mlとmLB培地で37℃16時間培養したEscherichia coli Y1090r-0.2 mlを混ぜ、37℃にて15分間インキュベートした。その後、混合液を2.5 ml LB-TOPアガロースに加えて均一とし、90mmφLB培地プレートにまいたものを10枚作製し、15分間室温で固化させ、42℃にて5時間インキュベーションし、いくつかのブランクを得、一次ス

クリーニングと同様にして二次スクリーニングを行った。

#### 実施例 4：新規ヒトスカベンジャーレセプターの塩基配列の決定

二次スクリーニングで得られた陽性クローンのうち適切と考えられるク  
ローンのブランクをプレートから切り出し、蒸留水 200  $\mu$ l を入れたチュー  
5     ープに加えて 30 分間室温で攪拌した後、15,000 rpm で 5 分間遠心分離し  
、上清を得た。

得られた上清を鋳型とし、TaKaRa LA PCR Kit Ver.2 (宝酒造社製) を  
用い、PCRによりインサートDNAを増幅させた。PCRの反応組成は以下のと  
おりである (上清 : 27  $\mu$ l、10 x LA PCR 緩衝液 II ( $Mg^{2+}$  不含) :  
10      5  $\mu$ l、25 mM  $MgCl_2$  : 5  $\mu$ l、dNTPミックス : 8  $\mu$ l、20  $\mu$ M  $\lambda$ gt11 Reve  
rseプライマー (配列番号 11、5'-ttgacaccagaccaactggtaatg-3') :  
2.5  $\mu$ l、20  $\mu$ M  $\lambda$ gt11 Forwardプライマー (配列番号 12、5'-ggtagcg  
acgaactcctggagcccg-3') : 2.5  $\mu$ l、LA Taq ポリメラーゼ : 0.5  $\mu$ l、 $H_2$   
O : 全容量 50  $\mu$ l になるように添加) PCR反応は、アプライドバイオシス  
15      テムズ社製ジーンAmp PCRシステム9600を用いて、98℃20秒、68℃5分の  
サイクルを30回行った。PCR産物は、1%アカロースゲル電気泳動にて確認  
後、ゲルからの切り出しにより精製した。精製には、ファルマシア社製  
Sephaglas BandPrep Kitを用いた。

切り出したDNA断片は、インビトロジェン社製TAクローニングキットの  
20      pCR2.1ベクターに組み込んだ。組換えたベクターは、インビトロジェン社  
製TAクローニングキットに含まれるTOP10F'細胞に形質転換した。形質転  
換体をLB培地 (100  $\mu$ g/ml アンピシリン) で培養し、アルカリSDS法によ  
り各クローンにつき3種類のプラスミドDNAを抽出した。

得られたDNAを適当と考えられる制限酵素で切断し、各DNA断片をpUC1  
25      8ベクターに組込み、XL1-Blue cellに形質転換した。形質転換体をLB培  
地 (100  $\mu$ g/ml アンピシリン) で培養し、アルカリSDS法によりプラスミ

- ドを抽出した。CL-P1-2-1からは、EcoR I-Hind IIIフラグメント、Hind III-EcoR Iフラグメントを含むプラスミド、CL-P1-3-4からは、EcoR I-BamH Iフラグメント、BamH I-Sma Iフラグメント、Sma I-Hind IIIフラグメント、Kpn I-Sau3A Iフラグメント、Sau3A I-EcoR Iフラグメント、
- 5 EcoR I-Kpn Iフラグメント、EcoR I-Sma Iフラグメントを含むプラスミド、CL-P1-3-7からは、EcoR I-BamH Iフラグメント、BamH I-Sma Iフラグメント、Sma I-Hind IIIフラグメント、Kpn I-Sau3A Iフラグメント、Sau3A I-EcoR Iフラグメント、EcoR I-Kpn Iフラグメント、Kpn I-EcoR Iフラグメントを含むプラスミドを得た。プライマーはAutoRead Sequencing Kit (ファルマシア社製) 添付のM13 Universal Primer (配列番号 7)
- 10 、M13 Reverse Primer (配列番号 8) およびFITC (ファルマシア社製FluorePrime) にてラベルした以下のプライマーをDNA/RNAシンセサイザーを用いて作成し、ファルマシア社製オートリード・シーケンシング・キットおよびA. L. F. オートシーケンサーで全領域の塩基配列を決定した。
- 15 HPP 1 : 5'-フルオレセイン-cgtgaaaatgaatggaagtgg-3' (配列番号 1 3)
- 、
- HPP 2 : 5'-フルオレセイン-ttttatccattgctgttcttc-3' (配列番号 1 4)
- 、
- HPP 3 : 5'-フルオレセイン-ctggcagtcctccgaggtccag-3' (配列番号 1 5)
- 20 、
- HPP 5 : 5'-フルオレセイン-gctgggtcccccgagagcgt-3' (配列番号 1 6)

以上実施した塩基配列決定における概略は、図4に示す通りである。図4(a)に、得られたスカベンジャーレセプターのコレクチン構造部分のORFが示され、この中のG-X-Y (Gはグリシンを示し、XおよびYはいかなる

25 アミノ酸残基であってもよい) はコラーゲン様領域を表すものである。また、図4(b)に、上記各プライマー名、シーケンサーにより読み取られ

## 53

た塩基配列（矢印により表される）ならびにM13 Universal Primer（Uで表される）およびM13 Reverse Primer（Rで表される）を示す。

さらに Cap site cDNAを用いて、この配列の転写開始点を含む5'末端領域の塩基配列を決定した。

- 5 Cap Site cDNA, Human Liver (NIPPON GENE 社製) により、添付の IRC2 Primer (5'-caaggtacgccacagcgtatg-3' (配列番号 17)) および Applied Biosystems 社製 392A DNA/RNA シンセサイザーにより合成した TGP1 Primer (5'-tcttcagtttccctaataccc-3' (配列番号 18)) を用いて
- 10 第1回PCRを行った。反応混液は、総液量 50  $\mu$ l にて、LA PCR Buffer I (Mg<sup>2+</sup> 不含)、2.5 mM MgCl<sub>2</sub>、それぞれ200  $\mu$ MのdATP、dCTP、dGTP およびdTTP (以上 宝酒造社製) を1  $\mu$ l : Cap Site cDNA Human Liver , 0.5  $\mu$ M IRC2 Primer (以上 NIPPON GENE 社製)、ならびに0.5  $\mu$ M TG P1 Primerを含むものとした。PCRは、熱変性95℃にて20秒、アニーリング 60℃にて20秒、伸長反応72℃にて20秒を35サイクル、また繰り返し反応前
- 15 に熱変性95℃にて5分、最後に伸長反応72℃にて10分を含むプログラムで行った。第1回PCR終了後、nested PCR を行った。第1回PCR産物1  $\mu$ l を鋳型とし、プライマーは添付の2RC2 Primer (5'-gtacgccacagcgtatgatg c-3' (配列番号 19)) および合成 TGP2 Primer (5'-cattcttgacaaact tcatag-3' (配列番号 20)) (TGP1 Primer と同様にして合成したもの
- 20 ) を用い、第1回PCR と同様の反応組成、プログラム (但し、サイクル数は25サイクル) で行った。以上の PCR 反応は宝酒造社製 TaKaRa PCR Thermal Cycler 480 により行った。得られた PCR 産物をアガロースゲル電気泳動により確認後、バンドをゲルより切り出し、-80℃, 10 min. 凍結し、15000 rpm, 10 min. 遠心分離後、上清をエタノール沈澱すること
- 25 により精製した。

精製した DNA 断片は、Novagen 社製 pT7Blue Vector に組み込み、こ

のベクターをコンピテントセル XL1-Blue 細胞に形質転換した。形質転換体を LB 培地 (100  $\mu$ g/ml アンピシリン) で培養し、アルカリ SDS 法によりプラスミドを抽出し、Pharmacia 社製 AutoRead Sequencing Kit および A. L. F. DNA Sequencer で塩基配列の決定を行った。プライマーは

5 AutoRead Sequencing Kit 添付の M13 Universal Primer (配列番号 7) および M13 Reverse Primer (配列番号 8) を用いた。

さらに、N末端の確認のために得られたcDNAクローンのN末端部分のシーケンスから上流方向のプライマー: 5'-atcttgctgcagattcgtgac-3' (配列番号 2 1) を合成し、胎盤由来cDNAライブラリー (クローンテック社製)

10) のスクリーニングを行った。スクリーニングは合成した上流方向のプライマー: 5'-atcttgctgcagattcgtgac-3' (配列番号 2 1) とベクターに含まれる一部分のプライマー  $\lambda$ gt11 5' Sequencing Primer: 5'-gactcctggagcccg-3' (配列番号 2 2) を用いてPCRにより行った。2.5mM  $MgCl_2$ 、1 x LA PCR Buffer II ( $Mg^{2+}$  不含)、2U TaKaRa LA Taq、プライマー 2 種

15 (5'-atcttgctgcagattcgtgac-3' (配列番号 2 1)、 $\lambda$ gt11 5' Sequencing Primer: 5'-gactcctggagcccg-3' (配列番号 2 2)) をそれぞれ0.2  $\mu$ M、胎盤由来cDNAライブラリー1  $\mu$ l、水を全量50  $\mu$ lとなるように加え反応液を調製し、94°Cで2分間を1サイクル、94°Cで30秒間、60°Cで30秒間、72°Cで1分30秒間を50サイクル行った。

20 得られたcDNAをアガロースゲル電気泳動により分離し、エチジウムブロマイド溶液 (0.1  $\mu$ g/ml) で染色を行い、トランスイルミネーターで泳動パターンを確認したところ、約600bp相当のインサートが増幅されていることがわかった。そこで、この増幅された部分をアガロースゲルより切り出し、-80°C、10 min. 凍結し、15000 rpm, 10 min. 遠心分離後、上清

25 を取り、エタノール沈殿することにより精製した。精製した DNA 断片を、Novagen 社製 pT7BlueVector に組み込み、このベクターを大腸菌XL



I-Blueのコンピテントセルに形質転換した。形質転換体は、LB 培地 (50  $\mu$ g/ml アンピシリン) にて培養し、アルカリSDS法にて、プラスミドを抽出し、PE Applied Biosystems 社製 DNA Sequencing Kit およびシーケンサー ABI PRISM 377 で塩基配列の決定を行った。プライマーはPharmacia 社製 AutoRead Sequencing kit 添付の M13 Universal Primer (配列番号 7) および M13 Reverse Primer (配列番号 8) を用いた。

この結果、得られた塩基配列からN末端側に604塩基さらに長い配列であることが明らかとなった。以上のことから、ここで得られた h S R C L - P 1 の cDNAは 2628 塩基を含み、2226 塩基のORF (転写解読枠) を有し (配列番号 1) 、配列番号 2 に示される742のアミノ酸をアミノ酸をコードしていることが確認できた。

次いで、GenBankデータベースでDNAおよびアミノ酸についての相同性の検索を行った結果、得られたアミノ酸配列は、従来見出されているコレクチン/スカベンジャーレセプターのいずれとも異なる新規タンパク質の配列であることが明らかとなった。

また、配列番号 2 に示すアミノ酸配列の第 483 ~ 606 番目のアミノ酸が欠失した、配列番号 23 に示す塩基配列の第 74 ~ 1933 番目によってコードされる変異体 (配列番号 24) が得られた。

#### 実施例 5 : 新規マウススカベンジャーレセプターのcDNAの取得

h S R C L - P 1 と同様の方法により、マウス肝臓cDNAライブラリーのスクリーニングを行うことにより m S R C L - P 1 遺伝子を得ることができた。得られた m S R C L - P 1 の cDNA クローンは 2637 塩基を含み、2226 塩基のORF (転写解読枠) を有し (配列番号 3) 、配列番号 4 に示される742のアミノ酸をアミノ酸をコードしていることが確認できた。

#### 実施例 6 : h S R C L - P 1 の一過性発現ベクターpEGFP-N1-hSRCL-P

#### 1の構築

## 56

まず、配列番号 1 に示す h S R C L - P 1 の開始コドンから終止コドン  
までを ccgctcgcagcggtcaccatgaaagacgact の塩基配列（配列番号 2 5）から  
なるプライマーと tccccgcggtaatgcagatgacagtactgt の塩基配列（配列番号  
2 6）からなるプライマーを用いて、ヒト胎盤由来 cDNA ライブラリーを鋳  
5 型として、PCR（タカラ社製：Takara Thermal Cycler MP）により増幅さ  
せた。得られた h S R C L - P 1 cDNA を pT7Blue T-Vector（Novagen 社製  
）にライゲーションし、大腸菌 XLI-Blue にトランスフォーメーションを行っ  
た。得られたクローンから h S R C L - P 1 cDNA を含むプラスミドを精製  
した。シーケンサーにより得られたプラスミドの塩基配列を確認した後  
10 、誤りのないプラスミドを制限酵素 Xho I と Sac II で消化して、同様の酵  
素で消化し精製した pEGFP-N1 ベクター（クローンテック社製）にライゲ  
ーションを行った。ライゲーションしたプラスミドは、大腸菌 XLI-Blue にト  
ランスフォーメーション後、得られたクローンを培養し、プラスミドを精製  
し、一過性発現ベクター pEGFP-N1-hSRCL-P1 とした。

15 実施例 7：一過性発現システムを用いた h S R C L - P 1 の発現

実施例 6 で得られた発現ベクター pEGFP-N1-hSRCL-P1 と LIPOFECTAMINE  
2000（LF2000）Reagent（GIBCOBRL 社製）を用いて、CHO 細胞における  
一過性発現を試みた。まず、LF2000 Reagent 溶液（LF2000 Reagent 12  $\mu$   
1、Nutrient Mixture F-12 Ham（Ham' s F-12 培地、（シグマ社製）））  
20 0.2 ml を準備し、5 分間室温でインキュベートした後、ベクター溶液 0.2  
ml（pEGFP-N1-hSRCL-P1 ベクター 4  $\mu$ g、Ham' s F-12 培地）と混和し、  
20 分間インキュベートした。その後、35mm シャーレにて 2 ml Ham' s F-  
12 培地（5% FCS 含む）で高密度にまで培養した CHO 細胞に添加した。4 時  
間、37℃、5% CO<sub>2</sub> 下で培養を行った後、新しい培地と交換し、さらに続け  
25 て 20 時間、37℃、5% CO<sub>2</sub> 下で培養を行った。発現の有無に関しては、オリ  
ンパス社製倒立型システム顕微鏡 IX70 の蛍光観察システムにより、GFP の

蛍光像の観察を行うことにより確認できた。このようにして得られた細胞を、一過性に h S R C L - P 1 を発現した細胞とした。

実施例 8 : h S R C L - P 1 の安定発現細胞株作成用ベクター pcDNA3

.1/Myc-His A-hSRCL-P1の構築

- 5        まず、配列番号 1 に示す h S R C L - P 1 の開始コドンから終止コドン  
      までを aatgcgggccgcacccatgaaagacgacttcgcagag の塩基配列（配列番号 27  
      ）からなるプライマーと gctctagaccgcggtaatgcagatgacagtac の塩基配列（  
      配列番号 28）からなるプライマーを用いて、ヒト胎盤由来 cDNA ライブラ  
10        リーを鋳型として、PCR（タカラ社製：Takara Thermal Cycler MP）によ  
      り増幅させた。得られた h S R C L - P 1 cDNA を pT7Blue T-Vector（No  
      vagen 社製）にライゲーションし、大腸菌 XLI-Blue へのトランスフォーメー  
      ションを行った。得られたクローンから h S R C L - P 1 cDNA を含むブラ  
      スミドを精製し、シークエンサーにより塩基配列を確認後、誤りのないブ  
      ラスミドを制限酵素 Not I と Sac II で消化して、同様の酵素で消化し精製  
15        した pcDNA3.1/Myc-His A ベクター（Invitrogen 社製）にライゲーション  
      を行った。ライゲーションしたプラスミドは大腸菌 XLI-Blue にトランスフ  
      ォメーションした後、得られたクローンを培養し、プラスミドを精製して  
      、安定細胞株作成用ベクター pcDNA3.1/Myc-His A-hSRCL-P1 とした。

実施例 9 : h S R C L - P 1 の安定発現細胞株の作成

- 20        実施例 8 で得られた発現ベクター pcDNA3.1/Myc-His A-hSRCL-P1 と LI  
      POFECTAMINE 2000（LF2000）Reagent（GIBCOBRL 社製）を用いて、h S  
      R C L - P 1 の安定発現を試みた。まず、LF2000 Reagent 溶液 0.5 ml（  
      LF2000 Reagent 30  $\mu$ l、Ham' s F-12 培地）を準備し、5 分間室温でインキ  
      ュベートした後、ベクター溶液 0.5 ml（ベクター 10  $\mu$ g、Nutrient Mix  
25        ture F-12 Ham（Ham' s F-12 培地）（シグマ社製））と混和し、20 分間  
      インキュベートした。その後、25cm<sup>2</sup> フラスコにて 5 ml Ham' s F-12 培地

## 58

(5%FCS含む)で高密度にまで培養したCHO細胞に添加した。4時間、37℃、5%CO<sub>2</sub>下で培養を行った後、新しい培地と交換し、さらに続けて20時間、37℃、5%CO<sub>2</sub>下で培養を行った。次に、培地をHam's F-12培地(5%FCS、0.4 mg/ml Geneticin (GIBCOBRL社製)含む)に交換し、さらに、

5 10日間培養を行った。途中一度培地交換を行った。

この10日間の薬剤セレクションにより、形質転換細胞のみが生存し増殖したが、形質転換されなかった細胞は死滅した。得られた形質転換細胞から高発現な細胞を得るために、セルソーター (Becton Dickinson 社製)によりソーティングを行った。まず細胞表面に発現させたh S R C L - P

10 1の染色を行った。形質転換した25cm<sup>2</sup>フラスコの細胞を5 ml PBS(-)で2回洗浄した後、EDTA solution 0.02% (ナカライテスク社製) 0.3 mlで細胞をはがし、10 ml PBS(-)に懸濁した後、200 x g、7分間、4℃で遠心後、上清を除去した。残った細胞に抗myc 抗体 (Invitrogen社製)を2% FCS/PBS(-)で10倍希釈した溶液を50 μl 添加し、よく細胞を懸濁した後

15 、4℃で20分間インキュベーションした。その後、2% FCS/PBS(-)を10 ml添加し懸濁した後、200 x g、7分間、4℃で遠心後、上清を除去することにより洗浄を行った。残った細胞に、2% FCS/PBS(-)で10倍希釈した二次抗体Alexa488標識抗マウスIgG(H+L)溶液を50 μl 添加し、よく細胞を懸濁した後、4℃で20分間インキュベーションを行った。その後、2% FCS

20 /PBS(-)を10 ml 添加し懸濁した後、200 x g、7分間、4℃で遠心後、上清を除去することにより洗浄を行った。残った細胞を2% FCS/PBS(-)を0.5 mlに懸濁し、ソーティングサンプルとした。サンプルはセルストレーナーキャップ付き5 ml チューブ (Becton Dickinson 社製)を通した後にセルソーターにかけた。同様に処理した形質転換していないCHO細胞をコントロールとして、蛍光強度が10 倍以上コントロールよりも高いものをセレ

25 クションした。

これらの細胞を、あらかじめ、Ham's F-12培地 (5%FCS、0.4 mg/ml Geneticin含む) を100  $\mu$ l ずつ入れておいた96穴細胞培養用プレートに1穴あたり1細胞ずつ分配した。37℃、5%CO<sub>2</sub>下で培養を行い、1週間培養後、さらに、100  $\mu$ l ずつ培養液を加え、さらに1週間培養を行った。Geneticinによる薬剤セクションにより増殖してきたクローンを2分割して、12穴および24穴細胞培養用プレートに継代した。このとき、1穴に2細胞以上から増殖してきているようなクローンは除外し、12穴および24穴細胞培養用プレートには9:1の細胞比で細胞を播いた。37℃、5%CO<sub>2</sub>下で培養を行い、12穴のプレートの細胞が高密度にまで達した時、再び個々のクローンをソーティングにかける際と同様に染色後、FACSCalibur (Becton Dickinson 社製) にかけて、発現量の確認を行った。発現量の高いクローンを確認した後、それぞれ対応する24穴のプレートの細胞を、安定発現細胞株 (CHO/hSRCL-P1) とした。

#### 実施例 10 : hSRCL-P1 の結合特異性

実施例 9 で得られた安定発現細胞株CHO/hSRCL-P1を用いて (1) 酵母 (Zymosan A Bioparticles、Molecular Probes社製)、グラム陰性細菌 (Escherichia coli Bioparticles、Molecular Probes社製) もしくはグラム陽性細菌 (Staphylococcus aureus Bioparticles、Molecular Probes社製)、(2) 酸化LDL (2.0 mg/ml LDLに50  $\mu$ MのCuSO<sub>4</sub>を添加し24時間反応させたものをPBS(-)に透析したものである。)、(3) AGE-HSA (AGE-ヒト血清アルブミン、Ikeda, K. et al., Biochemistry 35(24), 8075-8083 (1996)に従って調製)、または(4) マンノース ( $\alpha$ -D-Mannose BP-Probe、生化学工業社製) もしくはフコース ( $\alpha$ -L-Fucose BP-Probe、生化学工業社製) に対するhSRCL-P1の結合特異性を調べた。

まず、CHO/hSRCL-P1を35 mmボトムディッシュ (松浪ガラス社製) に1 x 10<sup>5</sup>細胞播き、3日間37℃、5%CO<sub>2</sub>下で培養を行った。培養はHam's F-1

## 60

2培地 (5%FCS、0.4 mg/ml Geneticin含む) 2 ml、で行った。3日後、2% FCSを含むMinimum Essential Medium Alpha Medium ( $\alpha$  MEM/2%FCS) 1 ml で2回洗浄後、25  $\mu$  g/ml酵母、25  $\mu$  g/mlグラム陰性細菌、25  $\mu$  g/mlグラム陽性細菌、5  $\mu$  g/ml酸化LDL、10  $\mu$  g/ml AGE、または10  $\mu$  g/mlマンノースもしくは、10  $\mu$  g/mlフコースを含む $\alpha$  MEM/2%FCSをそれぞれ1 ml 添加し、4℃で3時間反応させ、その後1 ml  $\alpha$  MEM/2%FCSで5回洗浄した。

結合は以下のようにして確認した。先ず (2)、(3) および (4) に関しては、それぞれ、抗酸化フォスファチジルコリン抗体 (2)、抗HSA抗体

(BIOSSYS社製) (3)、streptavidin, Alexa594 conjugate (Molecular Probes社製) (4) をそれぞれ $\alpha$  MEM/2%FCSで100倍希釈して1 ml 添加し、さらに4℃で30分間インキュベーションし、その後、1ml  $\alpha$  MEM/2%FCSで3回洗浄した。次に、(1) から (4) すべてについて、4%パラホルムアルデヒド/ PBS(-)溶液0.2 ml を添加し、室温で20分間インキュベーションすることにより固定を行い、1ml TBSC (宝酒造社製TBS(Tris-Buffered Saline) Powderを規定量に滅菌蒸留水で調整したものに最終濃度5mMになるようにCaCl<sub>2</sub>を添加した緩衝液) で3回洗浄した。次に (2) および

(3) に関しては、二次抗体との反応を行った。すなわち、それぞれローダミン標識抗マウスIgM Mu Chain (Chemicon International 社製) (2) およびAlexa 594 抗ヤギIgG (H+L) (Molecular Probes社製) (3) を25% BlockAce (大日本製薬社製) / TBSCで200倍希釈して1 ml 添加し、さらに室温で30分間インキュベーションし、その後、1ml TBSCで3回洗浄した。

次いで、(1) から (4) についてSlowFade Light Antifade Kit (Molecular Probes社製) を用いてマウントし、蛍光顕微鏡での観察サンプルとした。各サンプルについて、オリンパス社製倒立型システム顕微鏡IX

70の蛍光観察システムにより蛍光像の観察を行った。その結果を、(1) については図5 (A : 酵母、B : グラム陰性細菌 (Escherichia coli)、

およびC : グラム陽性細菌 (Staphylococcus aureus) ) に、(2) ~ (4) については図6 (A : 酸化LDL、B : マンノース、およびC : AGE) にそれぞれ示す。これらの図面より明らかなとおり、(1) から (4) 全てにおいて、hSRCL-P1を安定に発現しているCHO細胞に、特異的な結合像を観察することができ、微生物を用いた図5A~Cに示す結果では、それぞれhSRCL-P1の染色箇所 (各左図、緑色染色) と各微生物の存在箇所 (各中央図、赤色染色) とが重複 (Overlap、各右図) しており、各微生物はhSRCL-P1に特異的に結合していることが明示された。

なお、一過性にhSRCL-P1を発現させた細胞 (実施例7参照) においても同様に、特異的結合を示す結果が得られた。

#### 実施例11 : hSRCL-P1のファゴサイトーシスによる結合物の細胞内取り込み

実施例7および9で得られたhSRCL-P1の一過性発現細胞および安定発現細胞株を用いて、実施例10に用いた各結合物の細胞内取り込みを観察した。実施例10に記載した方法を改良して、結合物との反応温度を37℃として行うことにより、結合物の取り込みを確認した。染色後、細胞内への取り込みの状態は、オリンパス社製共焦点レーザー顕微鏡を用いた三次元画像処理によって観察した。一過性発現細胞を用いた場合の結果を、酵母に対して得られたものについて図7に示すが、酵母 (赤色染色) がhSRCL-P1 (緑色発色) を発現している細胞内に取り込まれていること明らかとなった。また、安定発現細胞株を用いても同様の結果が得られた。

#### 実施例12 : 血管内皮細胞でのSRCL-P1発現の証明

hSRCL-P1の組織での発現・局在を確認するため、健常人およびマウス由来心臓のパラフィン包埋切片 (Novagen社製) を用い、以下の操

作により、蛍光免疫染色を実施した。

- 5      パラフィン包埋切片のスライドを染色バット中で、キシレンに室温で10分間、3回浸し、脱パラフィン処理を行った。その後100%-90%-80%-70%エタノールに室温で10分間ずつ、PBS (-) 溶液に10分間順次浸し、ハイドレーション処理を行った。

次に組織切片上の内因性のペルオキシダーゼ活性を抑制するため、スライドを3%過酸化水素含有PBS (-) 溶液に室温で10分間浸した後、ブロッケース（大日本製薬社製）に室温で1時間浸し、ブロッッキング処理を行った。

- 10      次に湿潤箱中で一次抗体として抗hSRC L-P1ラビットポリクローナル抗体（IgGフラクション、100 µg/ml）100 µlを組織切片に塗布し、室温で30分間反応させた。一次抗体を染色バット中で、洗浄液（Tris-HCl：pH7.5, 0.15M NaCl, 0.05% Tween 20）に浸し、室温で10分間緩やかに振とうしながら3回洗浄した後、二次抗体としてPOD（ペルオキシダーゼ）標識抗ラビットIgGヒツジ抗体（Boehringer Mannheim社製）を5 U/mlの濃度で一次抗体の時と同様に反応させ、洗浄した。その後Biotinyl Tyramide Amplification Reagent（NEN（商標名）、Life Science Products社製）をスライドに塗布し、室温で10分間反応させ、一次抗体の時と同様に洗浄した。
- 15      Avidin Alexa Fluor（商標名）488 conjugate（Molecular Probes社製）1 mg/mlをPBS (-) 溶液にて100倍に希釈し、その100 µlを湿潤箱中でスライド上の組織切片に塗布し、室温で30分間反応させ、一次抗体の時と同様に洗浄した後、SlowFade Light Antifade Kit（Molecular Probes社製）を用いてマウントし、蛍光顕微鏡（ニコン社製）での観察サンプルとした。また一次抗体のかわりに正常ウサギ血清を反応させ、同様の処理を行ったスライドを陰性コントロールとした。
- 20
- 25



63

その結果、図8に示すように、A：健常人およびB：マウスともに、心臓の血管内皮細胞に染色像が観察され（各左図）、かかる染色像は陰性コントロール（各右図）にはまったく認められなかった。従って、SRCLEP1は、心臓では血管内皮細胞に発現していることが明らかになり、ここで血管壁への酸化LDLやAGEなどの結合に関与している可能性が示唆された。

#### 【発明の効果】

本発明のSRCLEP1タンパク質は、SR構造およびコレクチン構造を有していることから、それらに特有の効果を示す物質と考えられ、マクロファージおよび基礎免疫の機能の解明、動脈硬化、糖尿病性合併症およびアルツハイマー病、高 $\beta$ リボ蛋白血症、高コレステロール血症、高トリグリセライド血症、低 $\alpha$ リボ蛋白血症、移植、アテレクトミーおよび血管形成後再狭窄、細菌感染症等を始めとする各種疾患等の発症機構の解明、さらにその診断、予防および治療法、ならびにそれらのための試薬や医薬の開発に利用できるものである。

## 請求の範囲

1. 配列番号2のアミノ酸番号1～742に示すアミノ酸742個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または配列番号2に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2のアミノ酸番号1～742に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、または、これらの誘導体もしくは断片。

2. 配列番号1の塩基番号74～2299に示す塩基配列、配列番号2のアミノ酸番号1～742に示すアミノ酸配列またはその断片をコードする塩基配列、または、これら塩基配列もしくはこれら塩基配列と相補的な塩基配列と、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号2のアミノ酸番号1～742に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む単離されたポリヌクレオチド。

3. 配列番号24のアミノ酸番号1～618に示すアミノ酸から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または配列番号24に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号24のアミノ酸番号1～618に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、または、これらの誘導体もしくは断片。

4. 配列番号23の塩基番号74～1933に示す塩基配列、配列番号24のアミノ酸番号1～618に示すアミノ酸配列またはその断片をコードする塩基配列、または、これら塩基配列もしくはこれら塩基配列と相補的な塩基配列と、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ

配列番号 24 のアミノ酸番号 1 ～ 618 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む単離されたポリヌクレオチド。

5 5. 配列番号 4 のアミノ酸番号 1 ～ 742 に示すアミノ酸 742 個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または配列番号 2 に示すアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号 2 のアミノ酸番号 1 ～ 742 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、または、これらの誘導体もしくは断片。

10 6. 配列番号 3 の塩基番号 74 ～ 2299 に示す塩基配列、配列番号 2 のアミノ酸番号 1 ～ 742 に示すアミノ酸配列またはその断片をコードする塩基配列、または、これら塩基配列もしくはこれら塩基配列と相補的な塩基配列と、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号 2 のアミノ酸番号 1 ～ 742 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む単離されたポリヌクレオチド。

7. 請求項 2、4 または 6 に記載のポリヌクレオチドを含むことを特徴とするベクター。

20 8. 請求項 2、4 または 6 に記載のポリヌクレオチドを発現可能に保持する形質転換細胞。

9. 請求項 2 または 4 に記載のポリヌクレオチドで形質転換した細胞を培養し、産生された hSRC L-P1 タンパク質を採取する工程を含むことを特徴とするタンパク質の製造法。

25 10. 請求項 6 に記載の塩基配列で形質転換した細胞を培養し、産生された mSRC L-P1 タンパク質を採取する工程を含むことを特徴とするタンパク質の製造法。

1 1. 細胞が大腸菌、動物細胞または昆虫細胞である、請求項 9 または 1 0 に記載の製造法。

1 2. SRCL-P 1 遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト動物。

5 1 3. SRCL-P 1 遺伝子が SRCL-P 1 をコードする cDNA、ゲノムDNAまたは合成DNAである請求項 1 2 記載のトランスジェニック非ヒト動物。

1 4. 遺伝子発現調節部位に変異を起こさせることにより発現レベルを変化させた請求項 1 3 記載のトランスジェニック非ヒト動物。

10 1 5. mSRCL-P 1 遺伝子の機能を欠損させたノックアウトマウス。

1 6. 請求項 1、3 または 5 に記載のタンパク質またはその断片に対する抗体。

15 1 7. ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体またはペプチド抗体である請求項 1 6 記載の抗体。

1 8. ヒト以外の温血動物に請求項 1、3 または 5 に記載のタンパク質またはその断片を投与し、抗体価の認められる該動物を選択し、脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することを含む、請求項 1、3 または 5 に記載のタンパク質またはその断片に対するモノクローナル抗体の製造方法。

20

1 9. 請求項 1 6 または 1 7 に記載の抗体と SRCL-P 1 タンパク質またはその断片との免疫学的な結合に基づいて、該タンパク質またはその断片を定量する方法。

25 2 0. 請求項 1 6 または 1 7 に記載の抗体と SRCL-P 1 タンパク質またはその断片との免疫学的な結合に基づいて、該タンパク質またはその

断片を検出する方法。

21. 請求項1、3または5に記載のタンパク質の活性を刺激するアゴニスト。

5 22. 請求項1、3または5に記載のタンパク質の活性または活性化を阻害するアンタゴニスト。

23. 請求項1、3または5に記載のタンパク質を用いることを特徴とする薬物のスクリーニング方法。

24. 請求項23に記載のスクリーニング方法によって得られた薬物。

10 25. 酸化LDL蓄積に関わる病態を処置するための薬物のスクリーニング方法であって、

請求項1、3または5に記載のタンパク質と酸化LDLとの結合量を、候補薬物の存在下および非存在下で比較することにより評価される、該タンパク質と酸化LDLとの結合に対する候補薬物の阻害能によって、酸化LDL蓄積に関わる病態を処置するための薬物を同定する工程を含むことを特徴とする薬物のスクリーニング方法。

26. 請求項25に記載のスクリーニング方法によって得られた薬物。

27. 酸化LDL蓄積に関わる病態を処置する方法であって、

請求項26に記載の薬物を用いて、SRC1タンパク質またはその断片と酸化LDLとの結合を阻害する工程を含むことを特徴とする方法。

20 28. 酸化LDL蓄積に関わる病態を処置するための医薬組成物であって、請求項26に記載の薬物を含む医薬組成物。

29. 細胞へのAGEの結合に関わる病態を処置するための薬物のスクリーニング方法であって、

25 請求項1、3または5に記載のタンパク質とAGEとの結合量を、候補薬物の存在下および非存在下で比較することにより評価される、該タンパク質とAGEとの結合に対する候補薬物の阻害能によって、細胞へのAGEの結合

に関わる病態を処置するための薬物を同定する工程を含むことを特徴とする薬物のスクリーニング方法。

30. 請求項29に記載のスクリーニング方法によって得られた薬物。

31. 細胞へのAGEの結合に関わる病態を処置する方法であって、

5 請求項30に記載の薬物を用いて、SRCL-P1タンパク質またはその断片とAGEとの結合を阻害する工程を含むことを特徴とする方法。

32. 細胞へのAGEの結合に関わる病態を処置するための医薬組成物であって、請求項30に記載の薬物を含む医薬組成物。

$\frac{1}{8}$

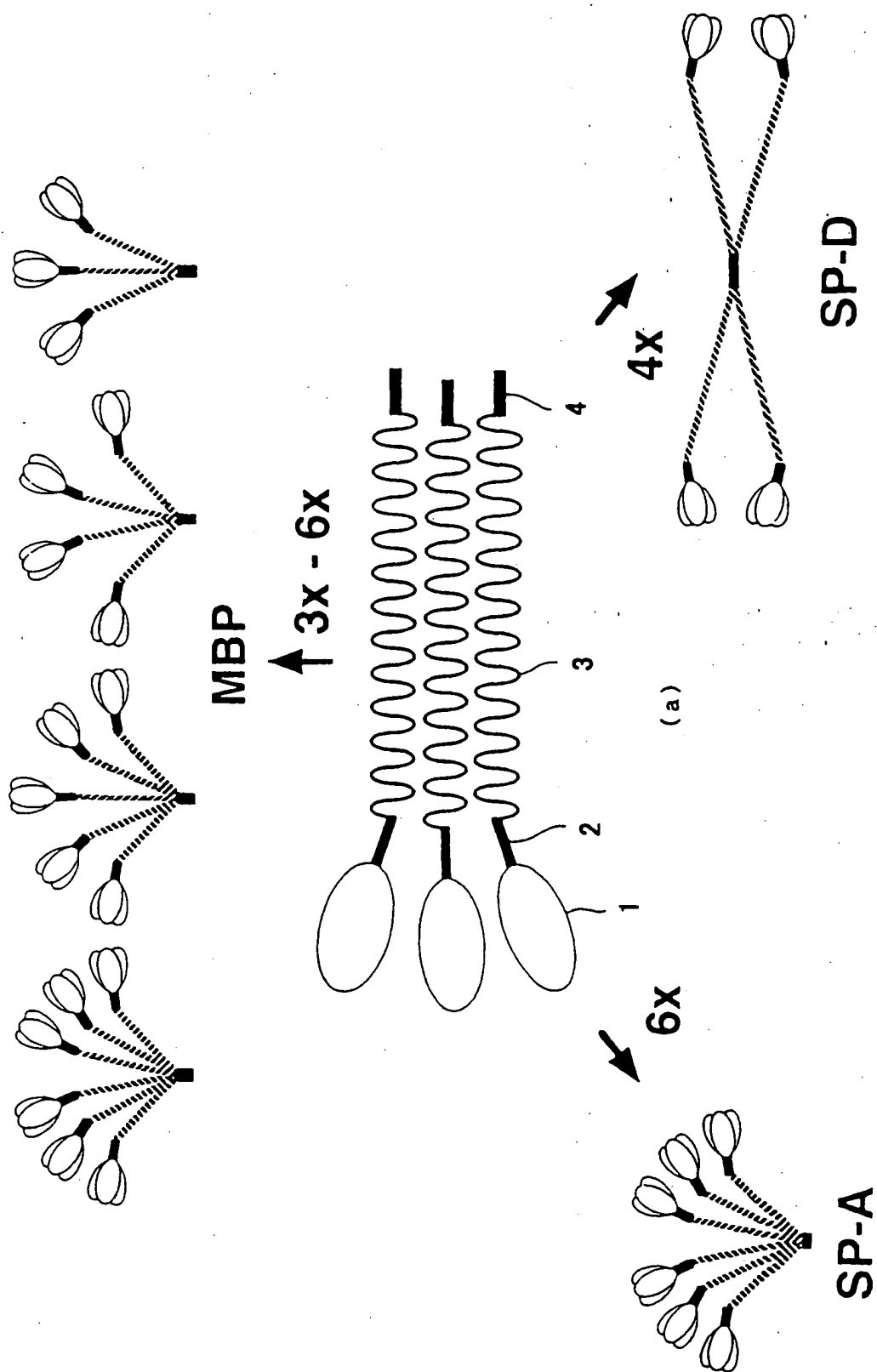


図 1

MSLEPS-LPLLLLSMVAASYSETVTCTEDAQKT----CPAVIACSS--PGINGFPKDGGRDGTKEGKEGPG  
 MWLCPALITLITLMA-----ASGAACEVQDVCV-----GSPG  
 MLLEFLL-SALVLLITQ-PLGLYLEAEMKTYSHRITTPSACTLM-MCSSVESGLPGRDGRDGPRGEKGDGP

$$\frac{2}{8}$$

IPGTPGSHGILPGRDGR-----DGVKGDPPGPPMGPFG-----ETP-----  
 IIPCAAGQACMPGOAGPVGPKGDNGSVGEPPGKGDITGSPGPPGPPGVPGPAGRECEPLGKQCNIGPQGKPGP 140

QGLRGLQGP-----PGKLGPPEPNPSPGSPGPKGQK  
-----RGEKGEPPGERGPPGL  
CPPENNGLPGAPGVPE-----  
KGEAGPKGEVGAPGMQGSACARGLAGPKKERGVPPGERGVPGNAGAAGSAGAMPGQSPGARGPPGLKGDK 210



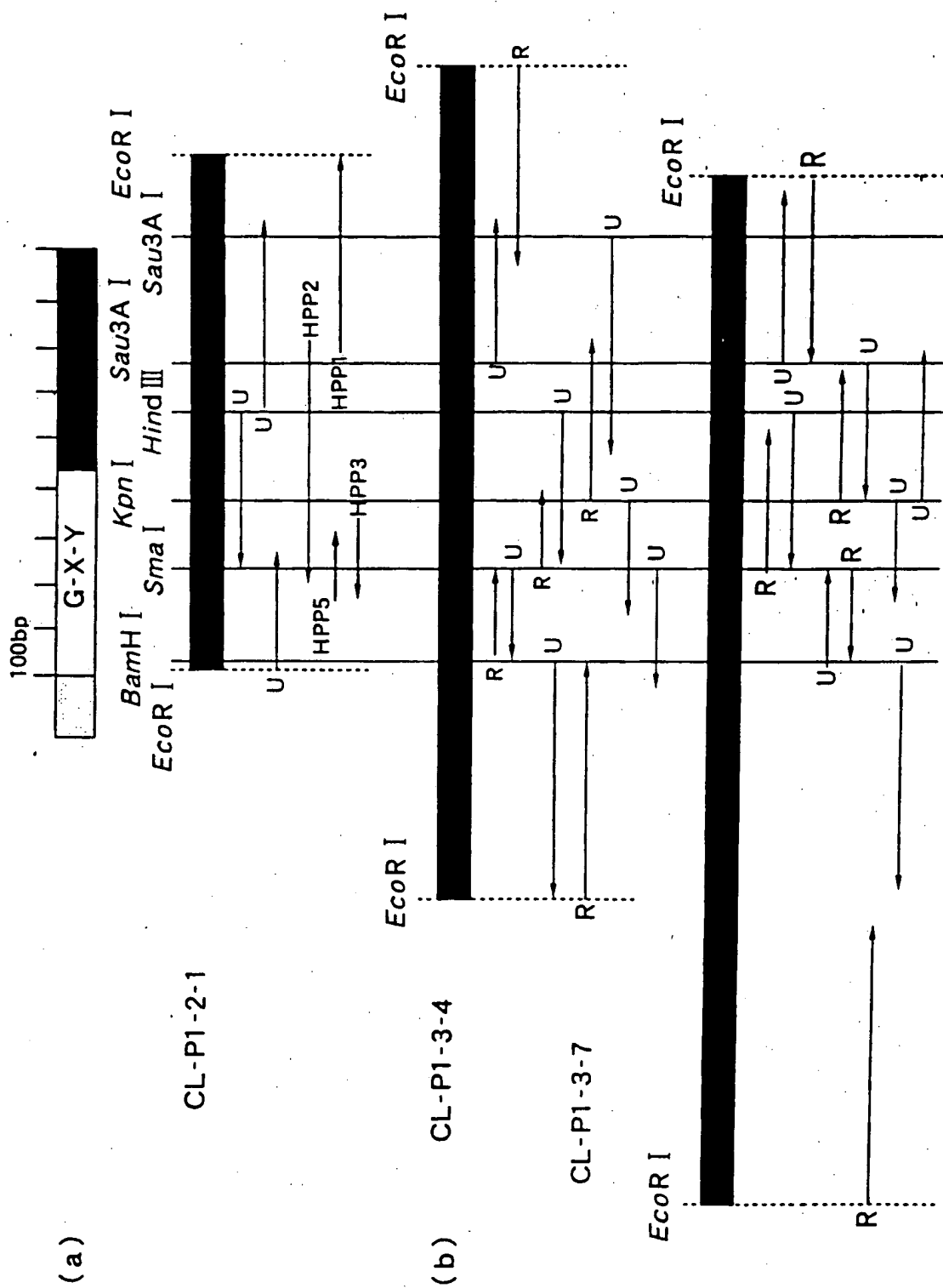
ω  
∞

LMBP GPG-KSPDGDSSLA-----SERKALQTEMARIKKWLTESLKQVGNKTELTNGEIMTEKVV  
 LSP-A --PAHLDEELQATLHD---FRHQILOTRGALS-LQSSI-----MTVGEKVFSSNGQSIITPDAI  
 LSP-D GIPGDKGAKGESGLPDVASIRQOQVEALQGVQVHLQAAFSQYKKVVEIFPNGQSVGEKIFKTAGFVKPFTEA 280

KALCVKFQASVATPRNAAENGAIQNLII---KEEAFLGITDEKTEGQFVDLTGNRLITYTNWNEGEPNNAGS  
 DEACARAGGRIAVPRNPENEAIASEVKKYNTYAYVGLTEGSPGDEFYSDGTPVNYTNWYRGEPAGRG-  
 QLLCTQAGGQILASPRSAENALQQLVVAKNAAFLSMTDSKTEGFIYPTGESLVYSNWAPEGEPNDDGG 350

DEDCVLLLLKNGQWNDVPCSTSLAVCEFP I \*  
 KEQCVEMYTDGQWNDRLYSLRTICEF \*--  
 SEDCVEIFINGKWNDRACGEKRLMVCEF \*--

4/8



5/8

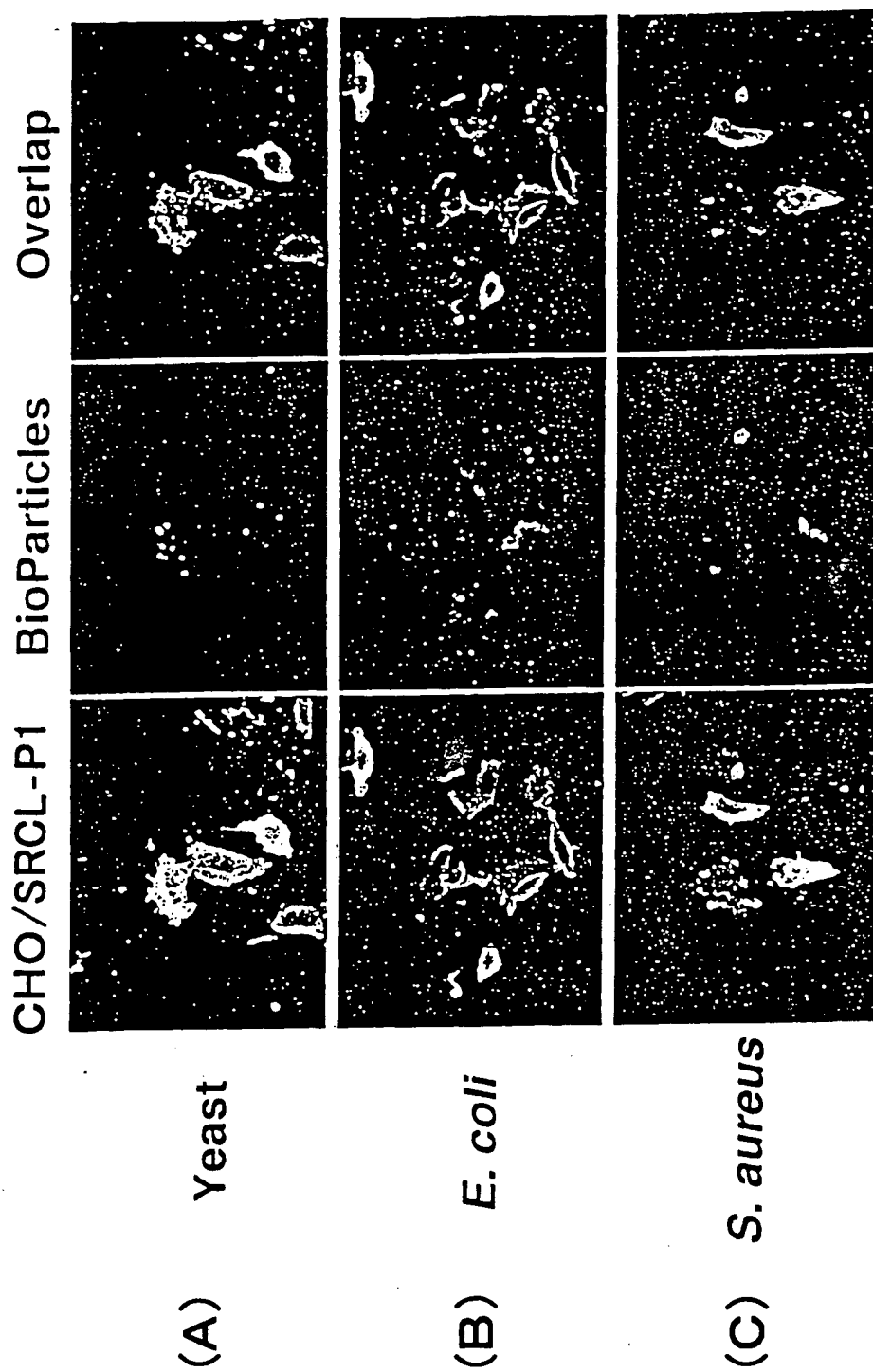
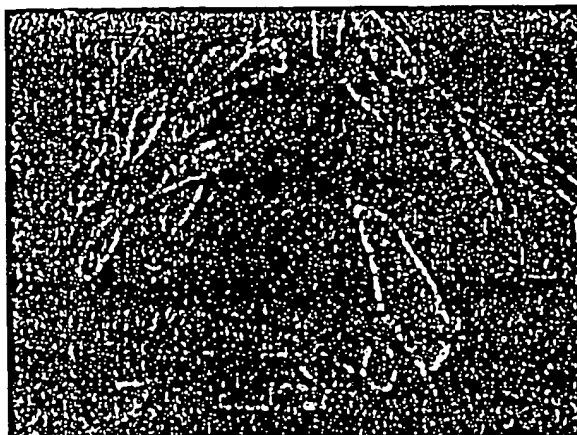


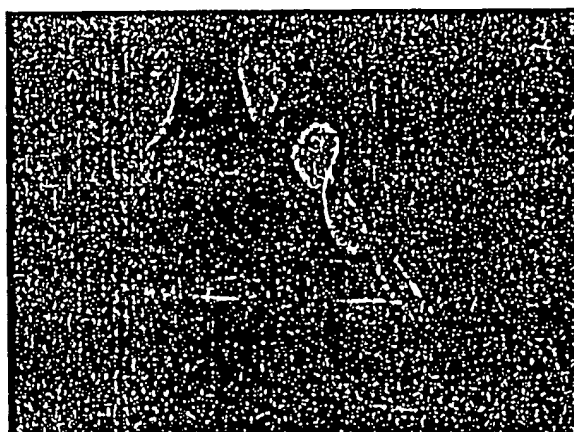
図 5

6/8

(A) OxLDL24



(B) マンノース



(C) AGE

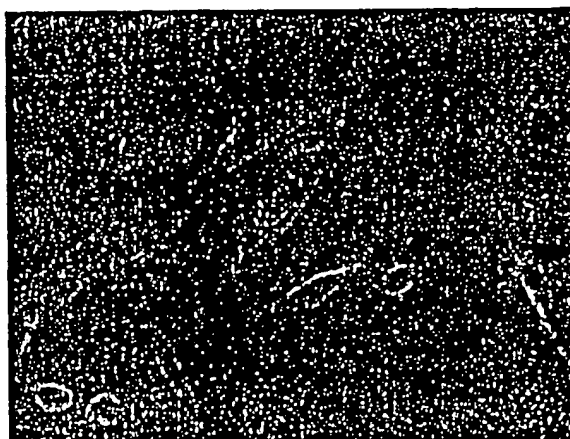
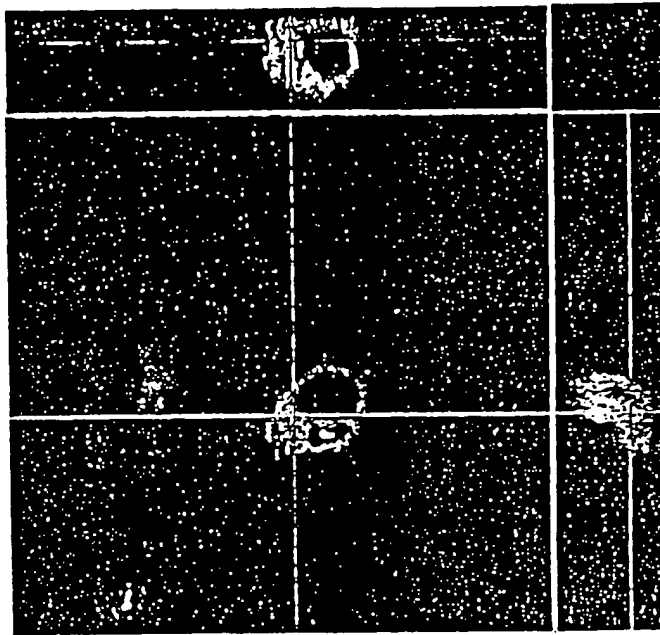


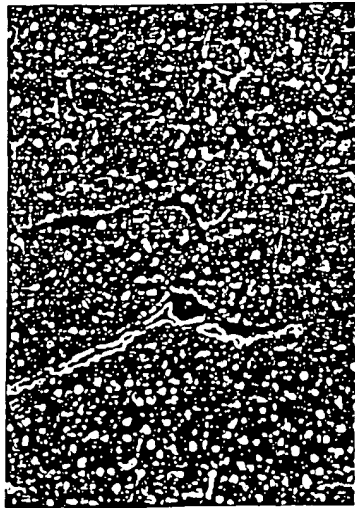
図 6

$\frac{7}{8}$ 

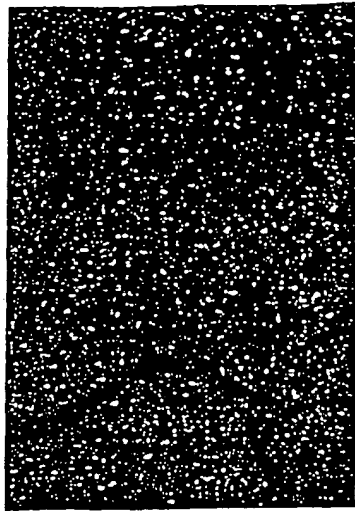
CHO/hSRCL-P1 : Green  
Yeast : Red

8/8

(A) 健常人心臓切片



抗hSRCL-P1ラビットポリクローナル抗体

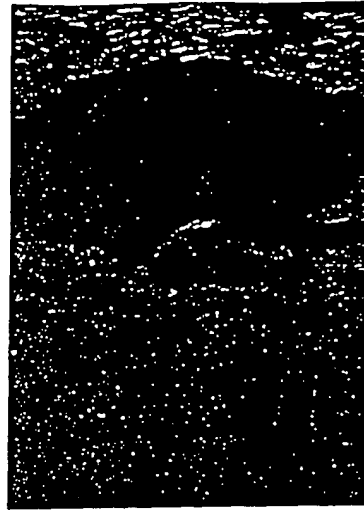


正常ウサギ血清  
陰性コントロール

(B) マウス心臓切片



抗hSRCL-P1ラビットポリクローナル抗体



正常ウサギ血清  
陰性コントロール

図 8

## SEQUENCE LISTING

<110> FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.

<120> Novel Scavenger Receptor

<130> 01P211WO

<160> 28

<210> 1

<211> 2628

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (74)..(2299)

<400> 1

ggggggacga cttctcggc tgcgcggcgc tgcgcgggag cccccggcc ggcgggtgcgt 60

ccccacggtc acc atg aaa gac gac ttc gca gag gag gag gag gtg caa 109

Met Lys Asp Asp Phe Ala Glu Glu Glu Glu Val Gln

1

5

10

tcc ttc ggt tac aag cgg ttt ggt att cag gaa gga aca caa tgt acc 157

Ser Phe Gly Tyr Lys Arg Phe Gly Ile Gln Glu Gly Thr Gln Cys Thr

15

20

25

aaa tgt aaa aat aac tgg gca ctg aag ttt tct atc ata tta tta tac 205

Lys Cys Lys Asn Asn Trp Ala Leu Lys Phe Ser Ile Ile Leu Leu Tyr

2/35

30	35	40	
all tlg tgl gcc tlg cta aca atc aca gla gcc att tlg gga tat aaa	253		
Ile Leu Cys Ala Leu Leu Thr Ile Thr Val Ala Ile Leu Gly Tyr Lys			
45	50	55	60
glt gla gag aaa atg gac aat gtc aca ggt ggc atg gaa aca tct cgc	301		
Val Val Glu Lys Met Asp Asn Val Thr Gly Gly Met Glu Thr Ser Arg			
65	70	75	
caa acc tat gat gac aag ctc aca gca gtg gaa agt gac ctg aaa aaa	349		
Gln Thr Tyr Asp Asp Lys Leu Thr Ala Val Glu Ser Asp Leu Lys Lys			
80	85	90	
tta ggt gac caa act ggg aag aaa gct atc agc acc aac tca gaa ctc	397		
Leu Gly Asp Gln Thr Gly Lys Lys Ala Ile Ser Thr Asn Ser Glu Leu			
95	100	105	
tcc acc ttc aga tca gac att cta gat ctc cgt cag caa ctt cgt gag	445		
Ser Thr Phe Arg Ser Asp Ile Leu Asp Leu Arg Gln Gln Leu Arg Glu			
110	115	120	
att aca gaa aaa acc agc aag aac aag gat acg ctg gag aag tta cag	493		
Ile Thr Glu Lys Thr Ser Lys Asn Lys Asp Thr Leu Glu Lys Leu Gln			
125	130	135	140
gcg agc ggg gat gct ctg gtg gac agg cag agt caa tlg aaa gaa act	541		
Ala Ser Gly Asp Ala Leu Val Asp Arg Gln Ser Gln Leu Lys Glu Thr			
145	150	155	
tlg gag aat aac tct ttc ctc atc acc act gla aac aaa acc ctc cag	589		
Leu Glu Asn Asn Ser Phe Leu Ile Thr Thr Val Asn Lys Thr Leu Gln			
160	165	170	
gcg tat aat ggc tat gtc acg aat ctg cag caa gat acc agc gtg ctc	637		
Ala Tyr Asn Gly Tyr Val Thr Asn Leu Gln Gln Asp Thr Ser Val Leu			
175	180	185	
cag ggc aat ctg cag aac caa atg tat tct cat aat gtg gtc atc atg	685		



3/35

Gln Gly Asn Leu Gln Asn Gln Met Tyr Ser His Asn Val Val Ile Met	
190	200
aac ctc aac aac ctg aac ctg acc cag gtg cag cag agg aac ctc atc	733
Asn Leu Asn Asn Leu Asn Leu Thr Gln Val Gln Gln Arg Asn Leu Ile	
205	210
acg aat ctg cag cgg tct gtg gat gac aca agc cag gct atc cag cga	781
Thr Asn Leu Gln Arg Ser Val Asp Asp Thr Ser Gln Ala Ile Gln Arg	
225	230
atc aag aac gac ttt caa aat ctg cag cag gtt ttt ctt caa gcc aag	829
Ile Lys Asn Asp Phe Gln Asn Leu Gln Gln Val Phe Leu Gln Ala Lys	
240	245
aag gac acg gat tgg ctg aag gag aaa gtg cag agc ttg cag acg ctg	877
Lys Asp Thr Asp Trp Leu Lys Glu Lys Val Gln Ser Leu Gln Thr Leu	
255	260
gct gcc aac aac tct gcg ttg gcc aaa gcc aac aac gac acc ctg gag	925
Ala Ala Asn Asn Ser Ala Leu Ala Lys Ala Asn Asn Asp Thr Leu Glu	
270	275
gat atg aac agc cag ctc aac tca ttc aca ggt cag atg gag aac atc	973
Asp Met Asn Ser Gln Leu Asn Ser Phe Thr Gly Gln Met Glu Asn Ile	
285	290
acc act atc tct caa gcc aac gag cag aac ctg aaa gac ctg cag gac	1021
Thr Thr Ile Ser Gln Ala Asn Glu Gln Asn Leu Lys Asp Leu Gln Asp	
305	310
tta cac aaa gat gca gag aat aga aca gcc atc aag ttc aac caa ctg	1069
Leu His Lys Asp Ala Glu Asn Arg Thr Ala Ile Lys Phe Asn Gln Leu	
320	325
gag gaa cgc ttc cag ctc ttt gag acg gat att gtg aac atc att agc	1117
Glu Glu Arg Phe Gln Leu Phe Glu Thr Asp Ile Val Asn Ile Ile Ser	
335	340
	345

4/35

aat atc agt tac aca gcc cac cac ctg cgg acg ctg acc agc aat cta	1165
Asn Ile Ser Tyr Thr Ala His His Leu Arg Thr Leu Thr Ser Asn Leu	
350 355 360	
aat gaa gtc agg acc act tgc aca gat acc ctt acc aaa cac aca gat	1213
Asn Glu Val Arg Thr Thr Cys Thr Asp Thr Leu Thr Lys His Thr Asp	
365 370 375 380	
gat ctg acc tcc ttg aat aat acc ctg gcc aac atc cgt ttg gat tct	1261
Asp Leu Thr Ser Leu Asn Asn Thr Leu Ala Asn Ile Arg Leu Asp Ser	
385 390 395	
gtt tct ctc agg atg caa caa gat ttg atg agg tgc agg tta gac act	1309
Val Ser Leu Arg Met Gln Gln Asp Leu Met Arg Ser Arg Leu Asp Thr	
400 405 410	
gaa gla gcc aac tta tca gtg att atg gaa gaa atg aag cta gta gac	1357
Glu Val Ala Asn Leu Ser Val Ile Met Glu Glu Met Lys Leu Val Asp	
415 420 425	
tcc aag cat ggt cag ctc atc aag aat ttt aca ata cta caa ggt cca	1405
Ser Lys His Gly Gln Leu Ile Lys Asn Phe Thr Ile Leu Gln Gly Pro	
430 435 440	
ccg ggc ccc agg ggt cca aga ggt gac aga gga tcc cag gga ccc cct	1453
Pro Gly Pro Arg Gly Pro Arg Gly Asp Arg Gly Ser Gln Gly Pro Pro	
445 450 455 460	
ggc cca act ggc aac aag gga cag aaa gga gag aag ggg gag cct gga	1501
Gly Pro Thr Gly Asn Lys Gly Gln Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly	
465 470 475	
cca cct ggc cct gcg ggt gag aga ggc cca att gga cca gct ggt ccc	1549
Pro Pro Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Pro Ile Gly Pro Ala Gly Pro	
480 485 490	
ccc gga gag cgt ggc ggc aaa gga tct aaa ggc tcc cag ggc ccc aaa	1597
Pro Gly Glu Arg Gly Gly Lys Gly Ser Lys Gly Ser Gln Gly Pro Lys	

5/35

495	500	505	
ggc tcc cgt ggt tcc cct ggg aag ccc ggc cct cag ggc ccc agt ggg			1645
Gly Ser Arg Gly Ser Pro Gly Lys Pro Gly Pro Gln Gly Pro Ser Gly			
510	515	520	
gac cca ggc ccc ccg ggc cca cca ggc aaa gag gga ctc ccc ggc cct			1693
Asp Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Lys Glu Gly Leu Pro Gly Pro			
525	530	535	540
cag ggc cct cct ggc ttc cag gga ctt cag ggc acc gtt ggg gag cct			1741
Gln Gly Pro Pro Gly Phe Gln Gly Leu Gln Gly Thr Val Gly Glu Pro			
	545	550	555
ggg gtg cct gga cct cgg gga ctg cca ggc ttg cct ggg gta cca ggc			1789
Gly Val Pro Gly Pro Arg Gly Leu Pro Gly Leu Pro Gly Val Pro Gly			
	560	565	570
atg cca ggc ccc aag ggc ccc ccc ggc cct cct ggc cca tca gga gcg			1837
Met Pro Gly Pro Lys Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ser Gly Ala			
	575	580	585
gtg gtg ccc ctg gcc ctg cag aat gag cca acc ccg gca ccg gag gac			1885
Val Val Pro Leu Ala Leu Gln Asn Glu Pro Thr Pro Ala Pro Glu Asp			
	590	595	600
aat ggc tgc ccg cct cac tgg aag aac ttc aca gac aaa tgc tac tat			1933
Asn Gly Cys Pro Pro His Trp Lys Asn Phe Thr Asp Lys Cys Tyr Tyr			
605	610	615	620
ttt tca gtt gag aaa gaa att ttt gag gat gca aag ctt ttc tgt gaa			1981
Phe Ser Val Glu Lys Glu Ile Phe Glu Asp Ala Lys Leu Phe Cys Glu			
	625	630	635
gac aag tct tca cat ctt gtt ttc ata aac act aga gag gaa cag caa			2029
Asp Lys Ser Ser His Leu Val Phe Ile Asn Thr Arg Glu Glu Gln Gln			
	640	645	650
tgg ata aaa aaa cag atg gla ggg aga gag agc cac tgg atc ggc ctc			2077

6/35

Trp Ile Lys Lys Gln Met Val Gly Arg Glu Ser His Trp Ile Gly Leu  
 655 660 665  
 aca gac tca gag cgt gaa aat gaa tgg aag tgg ctg gat ggg aca tct 2125  
 Thr Asp Ser Glu Arg Glu Asn Glu Trp Lys Trp Leu Asp Gly Thr Ser  
 670 675 680  
 cca gac tac aaa aat tgg aaa gct gga cag ccg gat aac tgg ggt cat 2173  
 Pro Asp Tyr Lys Asn Trp Lys Ala Gly Gln Pro Asp Asn Trp Gly His  
 685 690 695 700  
 ggc cat ggg cca gga gaa gac tgt gct ggg ttg att tat gct ggg cag 2221  
 Gly His Gly Pro Gly Glu Asp Cys Ala Gly Leu Ile Tyr Ala Gly Gln  
 705 710 715  
 tgg aac gat ttc caa tgt gaa gac gtc aat aac ttc att tgc gaa aaa 2269  
 Trp Asn Asp Phe Gln Cys Glu Asp Val Asn Asn Phe Ile Cys Glu Lys  
 720 725 730  
 gac agg gag aca gta ctg tca tct gca tta taacggactg tga tgggatc 2319  
 Asp Arg Glu Thr Val Leu Ser Ser Ala Leu  
 735 740  
 acatgagcaa attttcagct ctcaaaggca aaggacactc ctltctaatl gcatcacctt 2379  
 ctcacagat tgaaaaaaaaa aaaagcacig aaaaccaatt actgaaaaaaaa aatlgacagc 2439  
 tagtgttttt taccatccgt callacccaa agacttggga actaaaaatgt tccccagggt 2499  
 gatattctga ttttcattgt gcacatggac tgaatcacat agattctcct ccgtcagtaa 2559  
 ccgtgcgatt atacaaatta tgccttccaa agtatggaac actccaatca gaaaaagggt 2619  
 atcatcccg 2628

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 742

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo Sapiens

7/35

&lt;220&gt;

<223> Deduced Amino Acid Sequence of Novel Humna Scavenger Receptor from Nucleotide Sequence.

&lt;400&gt; 2

```

Met Lys Asp Asp Phe Ala Glu Glu Glu Glu Val Gln Ser Phe Gly Tyr
  1             5             10             15
Lys Arg Phe Gly Ile Gln Glu Gly Thr Gln Cys Thr Lys Cys Lys Asn
      20             25             30
Asn Trp Ala Leu Lys Phe Ser Ile Ile Leu Leu Tyr Ile Leu Cys Ala
      35             40             45
Leu Leu Thr Ile Thr Val Ala Ile Leu Gly Tyr Lys Val Val Glu Lys
      50             55             60
Met Asp Asn Val Thr Gly Gly Met Glu Thr Ser Arg Gln Thr Tyr Asp
  65             70             75             80
Asp Lys Leu Thr Ala Val Glu Ser Asp Leu Lys Lys Leu Gly Asp Gln
      85             90             95
Thr Gly Lys Lys Ala Ile Ser Thr Asn Ser Glu Leu Ser Thr Phe Arg
      100            105            110
Ser Asp Ile Leu Asp Leu Arg Gln Gln Leu Arg Glu Ile Thr Glu Lys
      115            120            125
Thr Ser Lys Asn Lys Asp Thr Leu Glu Lys Leu Gln Ala Ser Gly Asp
      130            135            140
Ala Leu Val Asp Arg Gln Ser Gln Leu Lys Glu Thr Leu Glu Asn Asn
  145            150            155            160
Ser Phe Leu Ile Thr Thr Val Asn Lys Thr Leu Gln Ala Tyr Asn Gly
      165            170            175
Tyr Val Thr Asn Leu Gln Gln Asp Thr Ser Val Leu Gln Gly Asn Leu
      180            185            190

```

8/35

Gln Asn Gln Met Tyr Ser His Asn Val Val Ile Met Asn Leu Asn Asn  
 195 200 205  
 Leu Asn Leu Thr Gln Val Gln Gln Arg Asn Leu Ile Thr Asn Leu Gln  
 210 215 220  
 Arg Ser Val Asp Asp Thr Ser Gln Ala Ile Gln Arg Ile Lys Asn Asp  
 225 230 235 240  
 Phe Gln Asn Leu Gln Gln Val Phe Leu Gln Ala Lys Lys Asp Thr Asp  
 245 250 255  
 Trp Leu Lys Glu Lys Val Gln Ser Leu Gln Thr Leu Ala Ala Asn Asn  
 260 265 270  
 Ser Ala Leu Ala Lys Ala Asn Asn Asp Thr Leu Glu Asp Met Asn Ser  
 275 280 285  
 Gln Leu Asn Ser Phe Thr Gly Gln Met Glu Asn Ile Thr Thr Ile Ser  
 290 295 300  
 Gln Ala Asn Glu Gln Asn Leu Lys Asp Leu Gln Asp Leu His Lys Asp  
 305 310 315 320  
 Ala Glu Asn Arg Thr Ala Ile Lys Phe Asn Gln Leu Glu Glu Arg Phe  
 325 330 335  
 Gln Leu Phe Glu Thr Asp Ile Val Asn Ile Ile Ser Asn Ile Ser Tyr  
 340 345 350  
 Thr Ala His His Leu Arg Thr Leu Thr Ser Asn Leu Asn Glu Val Arg  
 355 360 365  
 Thr Thr Cys Thr Asp Thr Leu Thr Lys His Thr Asp Asp Leu Thr Ser  
 370 375 380  
 Leu Asn Asn Thr Leu Ala Asn Ile Arg Leu Asp Ser Val Ser Leu Arg  
 385 390 395 400  
 Met Gln Gln Asp Leu Met Arg Ser Arg Leu Asp Thr Glu Val Ala Asn  
 405 410 415  
 Leu Ser Val Ile Met Glu Glu Met Lys Leu Val Asp Ser Lys His Gly

9/35

420	425	430	
Gln Leu Ile Lys Asn Phe Thr Ile Leu Gln Gly Pro Pro Gly Pro Arg			
435	440	445	
Gly Pro Arg Gly Asp Arg Gly Ser Gln Gly Pro Pro Gly Pro Thr Gly			
450	455	460	
Asn Lys Gly Gln Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Pro Pro Gly Pro			
465	470	475	480
Ala Gly Glu Arg Gly Pro Ile Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Glu Arg			
485	490	495	
Gly Gly Lys Gly Ser Lys Gly Ser Gln Gly Pro Lys Gly Ser Arg Gly			
500	505	510	
Ser Pro Gly Lys Pro Gly Pro Gln Gly Pro Ser Gly Asp Pro Gly Pro			
515	520	525	
Pro Gly Pro Pro Gly Lys Glu Gly Leu Pro Gly Pro Gln Gly Pro Pro			
530	535	540	
Gly Phe Gln Gly Leu Gln Gly Thr Val Gly Glu Pro Gly Val Pro Gly			
545	550	555	560
Pro Arg Gly Leu Pro Gly Leu Pro Gly Val Pro Gly Met Pro Gly Pro			
565	570	575	
Lys Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ser Gly Ala Val Val Pro Leu			
580	585	590	
Ala Leu Gln Asn Glu Pro Thr Pro Ala Pro Glu Asp Asn Gly Cys Pro			
595	600	605	
Pro His Trp Lys Asn Phe Thr Asp Lys Cys Tyr Tyr Phe Ser Val Glu			
610	615	620	
Lys Glu Ile Phe Glu Asp Ala Lys Leu Phe Cys Glu Asp Lys Ser Ser			
625	630	635	640
His Leu Val Phe Ile Asn Thr Arg Glu Glu Gln Gln Trp Ile Lys Lys			
645	650	655	

10/35

Gln Met Val Gly Arg Glu Ser His Trp Ile Gly Leu Thr Asp Ser Glu

660

665

670

Arg Glu Asn Glu Trp Lys Trp Leu Asp Gly Thr Ser Pro Asp Tyr Lys

675

680

685

Asn Trp Lys Ala Gly Gln Pro Asp Asn Trp Gly His Gly His Gly Pro

690

695

700

Gly Glu Asp Cys Ala Gly Leu Ile Tyr Ala Gly Gln Trp Asn Asp Phe

705

710

715

720

Gln Cys Glu Asp Val Asn Asn Phe Ile Cys Glu Lys Asp Arg Glu Thr

725

730

735

Val Leu Ser Ser Ala Leu

740

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 2637

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mouse

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (92)... (2317)

&lt;400&gt; 3

gacgctagga ctggaacgct gaaggctgcc atgggcgtgc agtgagagac actggtacga 60

cttctccggg cggagcgtgt cctcagtcac c atg aaa gac gac ttt gca gag 112

Met Lys Asp Asp Phe Ala Glu

1

5

gaa gag gag gtc cag tcc ttc ggt tac aag agg ttt ggt att cag gag 160

Glu Glu Glu Val Gln Ser Phe Gly Tyr Lys Arg Phe Gly Ile Gln Glu



11/35

10	15	20	
ggg aca cag tgt acc aaa tgt aaa aat aac tgg gca ctg aag ttt tct			208
Gly Thr Gln Cys Thr Lys Cys Lys Asn Asn Trp Ala Leu Lys Phe Ser			
25	30	35	
att gta tta tta tac att ctg tgt gcc tta ctg acc atc aca gta gcc			256
Ile Val Leu Leu Tyr Ile Leu Cys Ala Leu Leu Thr Ile Thr Val Ala			
40	45	50	55
att ttg gga tat aaa gtt gta gag aaa atg gac aat gtc aca gat ggc			304
Ile Leu Gly Tyr Lys Val Val Glu Lys Met Asp Asn Val Thr Asp Gly			
60	65	70	
atg gag aca tct cac cag act tat gac aac aaa ctg act gct gtg gaa			352
Met Glu Thr Ser His Gln Thr Tyr Asp Asn Lys Leu Thr Ala Val Glu			
75	80	85	
agt gac ctg aag aaa tta ggg gat caa gct ggg aag aaa gct cta agt			400
Ser Asp Leu Lys Lys Leu Gly Asp Gln Ala Gly Lys Lys Ala Leu Ser			
90	95	100	
acc aac tct gag ctt tct acc ttc aga tca gat att ctg gat ctg cgt			448
Thr Asn Ser Glu Leu Ser Thr Phe Arg Ser Asp Ile Leu Asp Leu Arg			
105	110	115	
caa caa ctt cag gag atc aca gaa aaa acc agc aag aac aaa gat acg			496
Gln Gln Leu Gln Glu Ile Thr Glu Lys Thr Ser Lys Asn Lys Asp Thr			
120	125	130	135
ctg gag aag ttg caa gca aat ggg gac tca ttg gtt gat agg cag agt			544
Leu Glu Lys Leu Gln Ala Asn Gly Asp Ser Leu Val Asp Arg Gln Ser			
140	145	150	
cag ctg aag gaa act ctg cag aat aat tct ttc ctg att acc acc gtc			592
Gln Leu Lys Glu Thr Leu Gln Asn Asn Ser Phe Leu Ile Thr Thr Val			
155	160	165	
aac aaa aca ctg cag gca tat aat ggc tat gtc aca aat ctg caa caa			640

12/35

Asn Lys Thr Leu Gln Ala Tyr Asn Gly Tyr Val Thr Asn Leu Gln Gln	
170 175 180	
gal act agl glg ctc cag ggc aat ctg cag agc caa atg tat tct cag	688
Asp Thr Ser Val Leu Gln Gly Asn Leu Gln Ser Gln Met Tyr Ser Gln	
185 190 195	
agc glg gll atc atg aac ctc aac aac ctg aac cta acc cag gll cag	736
Ser Val Val Ile Met Asn Leu Asn Asn Leu Asn Leu Thr Gln Val Gln	
200 205 210 215	
cag agg aac ctt atc tca aat ctg cag cag tct gtg gat gac aca agc	784
Gln Arg Asn Leu Ile Ser Asn Leu Gln Gln Ser Val Asp Asp Thr Ser	
220 225 230	
ctg gcc atc cag cga att aag aat gat ttc caa aat ctg cag cag gll	832
Leu Ala Ile Gln Arg Ile Lys Asn Asp Phe Gln Asn Leu Gln Gln Val	
235 240 245	
ttc ctt caa gcc aag aag gac acc gat tgg cta aag gaa aaa gta cag	880
Phe Leu Gln Ala Lys Lys Asp Thr Asp Trp Leu Lys Glu Lys Val Gln	
250 255 260	
agc ttg cag aca ttg gct gcc aac aac tct gcc ctg gcc aaa gcc aac	928
Ser Leu Gln Thr Leu Ala Ala Asn Asn Ser Ala Leu Ala Lys Ala Asn	
265 270 275	
aat gac acc cta gag gat atg aat agc cag ctc agc tca ttc aca ggt	976
Asn Asp Thr Leu Glu Asp Met Asn Ser Gln Leu Ser Ser Phe Thr Gly	
280 285 290 295	
cag atg gac aac att acc act atc tca cag gcc aac gag cag agc ctg	1024
Gln Met Asp Asn Ile Thr Thr Ile Ser Gln Ala Asn Glu Gln Ser Leu	
300 305 310	
aaa gac ctt cag gac tta cac aag gat aca gaa aat aga aca gct gtc	1072
Lys Asp Leu Gln Asp Leu His Lys Asp Thr Glu Asn Arg Thr Ala Val	
315 320 325	

13/35

aag ttc agc caa ctt gag gaa cgc ttc cag gtc ttt gag aca gat att	1120
Lys Phe Ser Gln Leu Glu Glu Arg Phe Gln Val Phe Glu Thr Asp Ile	
330 335 340	
gtg aac atc att agc aac atc agc tac aca gcc cat cac ctg agg aca	1168
Val Asn Ile Ile Ser Asn Ile Ser Tyr Thr Ala His His Leu Arg Thr	
345 350 355	
ctg acc agc aat ctg aat gat gtt agg acc aca tgc aca gac acc ttg	1216
Leu Thr Ser Asn Leu Asn Asp Val Arg Thr Thr Cys Thr Asp Thr Leu	
360 365 370 375	
acc aga cac acg gat gac ctg acc tcc ttg aat aac aca cta gtc aac	1264
Thr Arg His Thr Asp Asp Leu Thr Ser Leu Asn Asn Thr Leu Val Asn	
380 385 390	
atc cgc ttg gat tct att tct ctc agg atg cag caa gac atg atg agg	1312
Ile Arg Leu Asp Ser Ile Ser Leu Arg Met Gln Gln Asp Met Met Arg	
395 400 405	
tca aag tta gac act gaa gtg gcc aac tta tca gtg gtt atg gaa gag	1360
Ser Lys Leu Asp Thr Glu Val Ala Asn Leu Ser Val Val Met Glu Glu	
410 415 420	
atg aaa ctg gtt gac tcc aag cac ggt cag ctc atc aag aac ttt acc	1408
Met Lys Leu Val Asp Ser Lys His Gly Gln Leu Ile Lys Asn Phe Thr	
425 430 435	
att cta caa ggt cct cct ggc ccc aga ggt cca aaa ggt gac aga gga	1456
Ile Leu Gln Gly Pro Pro Gly Pro Arg Gly Pro Lys Gly Asp Arg Gly	
440 445 450 455	
ctt cag gga cca cct ggt cca act ggc aac aag gga cag aaa gga gag	1504
Ser Gln Gly Pro Pro Gly Pro Thr Gly Asn Lys Gly Gln Lys Gly Glu	
460 465 470	
aag gga gag cct ggt cca cct ggc cct gcg ggt gag agg ggc aca att	1552
Lys Gly Glu Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Thr Ile	

14/35

475	480	485	
gga cca gtc ggc cct cct gga gag cgt ggc agc aaa gga tcc aaa ggc			1600
Gly Pro Val Gly Pro Pro Gly Glu Arg Gly Ser Lys Gly Ser Lys Gly			
490	495	500	
tca cag ggt ccc aaa gga tct cgt ggg tcc cca ggg aag cct ggc cct			1648
Ser Gln Gly Pro Lys Gly Ser Arg Gly Ser Pro Gly Lys Pro Gly Pro			
505	510	515	
caa gga cct agt ggg gac cca gga cca cca ggt cca cca ggc aag gat			1696
Gln Gly Pro Ser Gly Asp Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Lys Asp			
520	525	530	535
gga ctc cct ggc cct cag ggc cct cct ggc ttc cag gga cta cag ggc			1744
Gly Leu Pro Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly Phe Gln Gly Leu Gln Gly			
540	545	550	
act gtg ggt gag cct gga gta cct gga cct cgg ggg ttg cca ggc ttg			1792
Thr Val Gly Glu Pro Gly Val Pro Gly Pro Arg Gly Leu Pro Gly Leu			
555	560	565	
cca ggg gtg cca ggc atg cct ggg cct aag gga cca cct ggc cct cca			1840
Pro Gly Val Pro Gly Met Pro Gly Pro Lys Gly Pro Pro Gly Pro Pro			
570	575	580	
ggc ccc tca gga gca atg gag cca ttg gct ctg cag aat gaa cca acc			1888
Gly Pro Ser Gly Ala Met Glu Pro Leu Ala Leu Gln Asn Glu Pro Thr			
585	590	595	
cca gca tca gag gtc aac gga tgt ccg cct cac tgg aag aac ttc aca			1936
Pro Ala Ser Glu Val Asn Gly Cys Pro Pro His Trp Lys Asn Phe Thr			
600	605	610	615
gat aaa tgc tac tat ttt tca ttg gaa aaa gaa att ttt gaa gat gct			1984
Asp Lys Cys Tyr Tyr Phe Ser Leu Glu Lys Glu Ile Phe Glu Asp Ala			
620	625	630	
aag ctt ttc tgt gaa gac aaa tct tcc cat ctc gtt ttc ala aac tca			2032

15/35

Lys Leu Phe Cys Glu Asp Lys Ser Ser His Leu Val Phe Ile Asn Ser

635

640

645

aga gaa gaa cag caa tgg ata aaa aag cat acc gtg ggg aga gaa agc 2080

Arg Glu Glu Gln Gln Trp Ile Lys Lys His Thr Val Gly Arg Glu Ser

650

655

660

cat tgg atc ggc ctc aca gac tca gaa cag gaa agc gaa tgg aag tgg 2128

His Trp Ile Gly Leu Thr Asp Ser Glu Gln Glu Ser Glu Trp Lys Trp

665

670

675

cta gac ggg tca cct gtt gat tac aaa aac tgg aaa gct gga caa cca 2176

Leu Asp Gly Ser Pro Val Asp Tyr Lys Asn Trp Lys Ala Gly Gln Pro

680

685

690

695

gat aac tgg ggc agt ggc cat ggg cca gga gaa gac tgt gct ggc ttg 2224

Asp Asn Trp Gly Ser Gly His Gly Pro Gly Glu Asp Cys Ala Gly Leu

700

705

710

att tac gca gga cag tgg aat gac ttc cag tgt gat gaa atc aat aac 2272

Ile Tyr Ala Gly Gln Trp Asn Asp Phe Gln Cys Asp Glu Ile Asn Asn

715

720

725

ttc att tgt gag aag gaa agg gag gca gta cca tca tcc ata tta 2317

Phe Ile Cys Glu Lys Glu Arg Glu Ala Val Pro Ser Ser Ile Leu

730

735

740

taacagcaatg atataatagc agaaacatat tttctgaatgc ctctgaaagc cgaagaatgc 2377

tcgttttttga ttccatcact tctcaccaga ttgaatggaa aaagctctga aaagtagtta 2437

ttcaaaaataa atggacacct atgcacaat aacccaagga ctagggggct aaaatgcctc 2497

cccaagtltga tatattgatt tccagtgatc aaatggactg aatcgcatag attttctcag 2557

ccattaacca tagaatltat gcaaagtata tctttccaaa taiggaatgc tccaatcaga 2617

aaaagccaaa aaaaaaaaaa 2637

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 742

16/35

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mouse

&lt;220&gt;

<223> Deduced Amino Acid Sequence of Novel Mouse Scavenger Receptor from Nucleotide Sequence.

&lt;400&gt; 4

Met Lys Asp Asp Phe Ala Glu Glu Glu Glu Val Gln Ser Phe Gly Tyr

1 5 10 15

Lys Arg Phe Gly Ile Gln Glu Gly Thr Gln Cys Thr Lys Cys Lys Asn

20 25 30

Asn Trp Ala Leu Lys Phe Ser Ile Val Leu Leu Tyr Ile Leu Cys Ala

35 40 45

Leu Leu Thr Ile Thr Val Ala Ile Leu Gly Tyr Lys Val Val Glu Lys

50 55 60

Met Asp Asn Val Thr Asp Gly Met Glu Thr Ser His Gln Thr Tyr Asp

65 70 75 80

Asn Lys Leu Thr Ala Val Glu Ser Asp Leu Lys Lys Leu Gly Asp Gln

85 90 95

Ala Gly Lys Lys Ala Leu Ser Thr Asn Ser Glu Leu Ser Thr Phe Arg

100 105 110

Ser Asp Ile Leu Asp Leu Arg Gln Gln Leu Gln Glu Ile Thr Glu Lys

115 120 125

Thr Ser Lys Asn Lys Asp Thr Leu Glu Lys Leu Gln Ala Asn Gly Asp

130 135 140

Ser Leu Val Asp Arg Gln Ser Gln Leu Lys Glu Thr Leu Gln Asn Asn

145 150 155 160

Ser Phe Leu Ile Thr Thr Val Asn Lys Thr Leu Gln Ala Tyr Asn Gly

17/35

165	170	175
Tyr Val Thr Asn Leu Gln Gln Asp Thr Ser Val Leu Gln Gly Asn Leu		
180	185	190
Gln Ser Gln Met Tyr Ser Gln Ser Val Val Ile Met Asn Leu Asn Asn		
195	200	205
Leu Asn Leu Thr Gln Val Gln Gln Arg Asn Leu Ile Ser Asn Leu Gln		
210	215	220
Gln Ser Val Asp Asp Thr Ser Leu Ala Ile Gln Arg Ile Lys Asn Asp		
225	230	235
Phe Gln Asn Leu Gln Gln Val Phe Leu Gln Ala Lys Lys Asp Thr Asp		
245	250	255
Trp Leu Lys Glu Lys Val Gln Ser Leu Gln Thr Leu Ala Ala Asn Asn		
260	265	270
Ser Ala Leu Ala Lys Ala Asn Asn Asp Thr Leu Glu Asp Met Asn Ser		
275	280	285
Gln Leu Ser Ser Phe Thr Gly Gln Met Asp Asn Ile Thr Thr Ile Ser		
290	295	300
Gln Ala Asn Glu Gln Ser Leu Lys Asp Leu Gln Asp Leu His Lys Asp		
305	310	315
Thr Glu Asn Arg Thr Ala Val Lys Phe Ser Gln Leu Glu Glu Arg Phe		
325	330	335
Gln Val Phe Glu Thr Asp Ile Val Asn Ile Ile Ser Asn Ile Ser Tyr		
340	345	350
Thr Ala His His Leu Arg Thr Leu Thr Ser Asn Leu Asn Asp Val Arg		
355	360	365
Thr Thr Cys Thr Asp Thr Leu Thr Arg His Thr Asp Asp Leu Thr Ser		
370	375	380
Leu Asn Asn Thr Leu Val Asn Ile Arg Leu Asp Ser Ile Ser Leu Arg		
385	390	395
400		

18/35

Met Gln Gln Asp Met Met Arg Ser Lys Leu Asp Thr Glu Val Ala Asn  
 405 410 415  
 Leu Ser Val Val Met Glu Glu Met Lys Leu Val Asp Ser Lys His Gly  
 420 425 430  
 Gln Leu Ile Lys Asn Phe Thr Ile Leu Gln Gly Pro Pro Gly Pro Arg  
 435 440 445  
 Gly Pro Lys Gly Asp Arg Gly Ser Gln Gly Pro Pro Gly Pro Thr Gly  
 450 455 460  
 Asn Lys Gly Gln Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Pro Pro Gly Pro  
 465 470 475 480  
 Ala Gly Glu Arg Gly Thr Ile Gly Pro Val Gly Pro Pro Gly Glu Arg  
 485 490 495  
 Gly Ser Lys Gly Ser Lys Gly Ser Gln Gly Pro Lys Gly Ser Arg Gly  
 500 505 510  
 Ser Pro Gly Lys Pro Gly Pro Gln Gly Pro Ser Gly Asp Pro Gly Pro  
 515 520 525  
 Pro Gly Pro Pro Gly Lys Asp Gly Leu Pro Gly Pro Gln Gly Pro Pro  
 530 535 540  
 Gly Phe Gln Gly Leu Gln Gly Thr Val Gly Glu Pro Gly Val Pro Gly  
 545 550 555 560  
 Pro Arg Gly Leu Pro Gly Leu Pro Gly Val Pro Gly Met Pro Gly Pro  
 565 570 575  
 Lys Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ser Gly Ala Met Glu Pro Leu  
 580 585 590  
 Ala Leu Gln Asn Glu Pro Thr Pro Ala Ser Glu Val Asn Gly Cys Pro  
 595 600 605  
 Pro His Trp Lys Asn Phe Thr Asp Lys Cys Tyr Tyr Phe Ser Leu Glu  
 610 615 620  
 Lys Glu Ile Phe Glu Asp Ala Lys Leu Phe Cys Glu Asp Lys Ser Ser



19/35

625                      630                      635                      640  
 His Leu Val Phe Ile Asn Ser Arg Glu Glu Gln Gln Trp Ile Lys Lys  
                     645                      650                      655  
 His Thr Val Gly Arg Glu Ser His Trp Ile Gly Leu Thr Asp Ser Glu  
                     660                      665                      670  
 Gln Glu Ser Glu Trp Lys Trp Leu Asp Gly Ser Pro Val Asp Tyr Lys  
                     675                      680                      685  
 Asn Trp Lys Ala Gly Gln Pro Asp Asn Trp Gly Ser Gly His Gly Pro  
                     690                      695                      700  
 Gly Glu Asp Cys Ala Gly Leu Ile Tyr Ala Gly Gln Trp Asn Asp Phe  
 705                      710                      715                      720  
 Gln Cys Asp Glu Ile Asn Asn Phe Ile Cys Glu Lys Glu Arg Glu Ala  
                     725                      730                      735  
 Val Pro Ser Ser Ile Leu  
                     740

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Consensus sequence of three collectins which were reported heretofore.

&lt;400&gt; 5

Glu Asp Cys Val Leu Leu Leu Lys Asn Gly Gln Trp Asn Asp Val Pro

1

5

10

15

Cys Ser Thr Ser His Leu Ala Val Cys Glu Phe

20

20/35  
25

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Modified Consensus Sequence of collectins Hybridizable with Novel Collectin.

&lt;400&gt; 6

Glu Lys Cys Val Glu Met Tyr Thr Asp Gly Lys Trp Asn Asp Arg Asn

1

5

10

15

Cys Leu Gln Ser Arg Leu Ala Ile Cys Glu Phe

20

25

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; M13 Universal Primer Sequence for Sequencing.

&lt;400&gt; 7

cgacgttgta aaacgacggc cagt

24

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 17

21/35

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; M13 Reverse Primer Sequence for Sequencing.

&lt;400&gt; 8

caggaaaca gctatgac

17

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Sequence of a Reverse Primer for Screening a Novel Collectin.

&lt;400&gt; 9

caatcigatg agaaggatg g

21

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Sequence of a Forward Primer for Screening a Novel Collectin.

&lt;400&gt; 10

22/35

acgaggggct ggaigggaca t

21

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Sequence of a  $\lambda$ gt11 Reverse Primer for Sequencing.

&lt;400&gt; 11

ttgacaccag accaactggc aatg

24

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Sequence of a  $\lambda$ gt11 Forward Primer for Sequencing.

&lt;400&gt; 12

ggtagcgacg acicclggag cccg

24

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

23/35

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Sequence of a Primer for Screening a Novel Collectin.

&lt;400&gt; 13

cgtgaaaatg aatggaagtg g

21

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Sequence of a Primer for Screening a Novel Collectin.

&lt;400&gt; 14

ttttatccat tgcgttcct c

21

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Sequence of a Primer for Sequencing a Novel Collectin.

&lt;400&gt; 15

ctggcagtc ccgaggcca g

21

&lt;210&gt; 16

24/35

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Sequence of a Primer for Sequencing a Novel Collectin.

&lt;400&gt; 16

gctgggtcccc ccggagagcg l

21

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Sequence of a IRC2 Primer for Cap Site Sequencing.

&lt;400&gt; 17

caaggtacgc cacagcgtat g

21

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Sequence of a Synthetic TGPI Primer for Cap Site Sequencing.

25/35

&lt;400&gt; 18

tcctcagttt ccctaattccc

20

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Sequence of a 2RC2 Primer for Cap Site Sequencing.

&lt;400&gt; 19

gtacgccaca gcgtatgatg c

21

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Sequence of a Synthetic TGP2 Primer for Cap Site Sequencing.

&lt;400&gt; 20

catcttgac aaacttcata g

21

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

26/35

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Sequence of a Primer.

&lt;400&gt; 21

atcttgcctgc agattcgtga c

21

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Sequence of a  $\lambda$ gt11 5' Sequencing Primer.

&lt;400&gt; 22

gacttccttgga gccccg

15

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 2262

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo Sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (74)..(1933)

&lt;400&gt; 23



27/35

ggggggacga cttccctcggc igcgcgggcg cgcgcggag cttcccggcc ggcggtagcgt 60  
 cccacggc acc atg aaa gac gac ttc gca gag gag gag gag gtc caa 109  
 Met Lys Asp Asp Phe Ala Glu Glu Glu Glu Val Gln  
 1 5 10  
 tcc ttc ggt tac aag cgg ttt ggt att cag gaa gga aca caa tgt acc 157  
 Ser Phe Gly Tyr Lys Arg Phe Gly Ile Gln Glu Gly Thr Gln Cys Thr  
 15 20 25  
 aaa tgt aaa aat aac tgg gca ctg aag ttt tct atc ata tta tta tac 205  
 Lys Cys Lys Asn Asn Trp Ala Leu Lys Phe Ser Ile Ile Leu Leu Tyr  
 30 35 40  
 att ttg tgt gcc ttg cta aca atc aca gta gcc att ttg gga tat aaa 253  
 Ile Leu Cys Ala Leu Leu Thr Ile Thr Val Ala Ile Leu Gly Tyr Lys  
 45 50 55 60  
 gtt gta gag aaa atg gac aat gtc aca ggt ggc atg gaa aca tct cgc 301  
 Val Val Glu Lys Met Asp Asn Val Thr Gly Gly Met Glu Thr Ser Arg  
 65 70 75  
 caa acc tat gat gac aag ctc aca gca gtg gaa agt gac ctg aaa aaa 349  
 Gln Thr Tyr Asp Asp Lys Leu Thr Ala Val Glu Ser Asp Leu Lys Lys  
 80 85 90  
 tta ggt gac caa act ggg aag aaa gct atc agc acc aac tca gaa ctc 397  
 Leu Gly Asp Gln Thr Gly Lys Lys Ala Ile Ser Thr Asn Ser Glu Leu  
 95 100 105  
 tcc acc ttc aga tca gac att cta gat ctc cgt cag caa ctt cgt gag 445  
 Ser Thr Phe Arg Ser Asp Ile Leu Asp Leu Arg Gln Gln Leu Arg Glu  
 110 115 120  
 att aca gaa aaa acc agc aag aac aag gat acg ctg gag aag tta cag 493  
 Ile Thr Glu Lys Thr Ser Lys Asn Lys Asp Thr Leu Glu Lys Leu Gln  
 125 130 135 140  
 gcg agc ggg gat gct ctg gtg gac agg cag agt caa ttg aaa gaa act 541

28/35

Ala Ser Gly Asp Ala Leu Val Asp Arg Gln Ser Gln Leu Lys Glu Thr	
145 150 155	
ttg gag aat aac tct ttc ctc atc acc act gta aac aaa acc ctc cag	589
Leu Glu Asn Asn Ser Phe Leu Ile Thr Thr Val Asn Lys Thr Leu Gln	
160 165 170	
gcg tat aat ggc tat gtc acg aat ctg cag caa gat acc agc gtg ctc	637
Ala Tyr Asn Gly Tyr Val Thr Asn Leu Gln Gln Asp Thr Ser Val Leu	
175 180 185	
cag ggc aat ctg cag aac caa atg tat tct cat aat gtg gtc atc atg	685
Gln Gly Asn Leu Gln Asn Gln Met Tyr Ser His Asn Val Val Ile Met	
190 195 200	
aac ctc aac aac ctg aac ctg acc cag gtg cag cag agg aac ctc atc	733
Asn Leu Asn Asn Leu Asn Leu Thr Gln Val Gln Gln Arg Asn Leu Ile	
205 210 215 220	
acg aat ctg cag cgg tct gtg gat gac aca agc cag gct atc cag cga	781
Thr Asn Leu Gln Arg Ser Val Asp Asp Thr Ser Gln Ala Ile Gln Arg	
225 230 235	
atc aag aac gac ttt caa aat ctg cag cag gtt ttt ctt caa gcc aag	829
Ile Lys Asn Asp Phe Gln Asn Leu Gln Gln Val Phe Leu Gln Ala Lys	
240 245 250	
aag gac acg gat tgg ctg aag gag aaa gtg cag agc ttg cag acg ctg	877
Lys Asp Thr Asp Trp Leu Lys Glu Lys Val Gln Ser Leu Gln Thr Leu	
255 260 265	
gct gcc aac aac tct gcg ttg gcc aaa gcc aac aac gac acc ctg gag	925
Ala Ala Asn Asn Ser Ala Leu Ala Lys Ala Asn Asn Asp Thr Leu Glu	
270 275 280	
gat atg aac agc cag ctc aac tca ttc aca ggt cag atg gag aac atc	973
Asp Met Asn Ser Gln Leu Asn Ser Phe Thr Gly Gln Met Glu Asn Ile	
285 290 295 300	

29/35

acc act atc tct caa gcc aac gag cag aac ctg aaa gac ctg cag gac	1021
Thr Thr Ile Ser Gln Ala Asn Glu Gln Asn Leu Lys Asp Leu Gln Asp	
305 310 315	
tta cac aaa gat gca gag aat aga aca gcc atc aag ttc aac caa ctg	1069
Leu His Lys Asp Ala Glu Asn Arg Thr Ala Ile Lys Phe Asn Gln Leu	
320 325 330	
gag gaa cgc ttc cag ctc ttt gag acg gat att gig aac atc att agc	1117
Glu Glu Arg Phe Gln Leu Phe Glu Thr Asp Ile Val Asn Ile Ile Ser	
335 340 345	
aat atc agt tac aca gcc cac cac ctg cgg acg ctg acc agc aat cta	1165
Asn Ile Ser Tyr Thr Ala His His Leu Arg Thr Leu Thr Ser Asn Leu	
350 355 360	
aat gaa gtc agg acc act tgc aca gat acc cit acc aaa cac aca gat	1213
Asn Glu Val Arg Thr Thr Cys Thr Asp Thr Leu Thr Lys His Thr Asp	
365 370 375 380	
gat ctg acc tcc ttg aat aat acc ctg gcc aac atc cgt ttg gat tct	1261
Asp Leu Thr Ser Leu Asn Asn Thr Leu Ala Asn Ile Arg Leu Asp Ser	
385 390 395	
glt tct ctc agg atg caa caa gat ttg atg agg tcg agg tta gac act	1309
Val Ser Leu Arg Met Gln Gln Asp Leu Met Arg Ser Arg Leu Asp Thr	
400 405 410	
gaa gla gcc aac tta tca gtg att atg gaa gaa atg aag cta gla gac	1357
Glu Val Ala Asn Leu Ser Val Ile Met Glu Glu Met Lys Leu Val Asp	
415 420 425	
tcc aag cat ggt cag ctc atc aag aat ttt aca ata cta caa ggt cca	1405
Ser Lys His Gly Gln Leu Ile Lys Asn Phe Thr Ile Leu Gln Gly Pro	
430 435 440	
ccg ggc ccc agg ggt cca aga ggt gac aga gga tcc cag gga ccc cct	1453
Pro Gly Pro Arg Gly Pro Arg Gly Asp Arg Gly Ser Gln Gly Pro Pro	

30/35

445	450	455	460	
ggc cca act ggc aac aag gga cag aaa gga gag aag ggg gag cct gga				1501
Gly Pro Thr Gly Asn Lys Gly Gln Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly				
465	470	475		
cca cct ggc cct gcg ggc igc ccg cct cac tgg aag aac ttc aca gac				1549
Pro Pro Gly Pro Ala Gly Cys Pro Pro His Trp Lys Asn Phe Thr Asp				
480	485	490		
aaa tgc tac tat ttt tca gtt gag aaa gaa att ttt gag gat gca aag				1597
Lys Cys Tyr Tyr Phe Ser Val Glu Lys Glu Ile Phe Glu Asp Ala Lys				
495	500	505		
ctt ttc tgt gaa gac aag tct tca cat ctt gtt ttc ata aac act aga				1645
Leu Phe Cys Glu Asp Lys Ser Ser His Leu Val Phe Ile Asn Thr Arg				
510	515	520		
gag gaa cag caa tgg ata aaa aaa cag atg gta ggg aga gag agc cac				1693
Glu Glu Gln Gln Trp Ile Lys Lys Gln Met Val Gly Arg Glu Ser His				
525	530	535	540	
tgg atc ggc ctc aca gac tca gag cgt gaa aat gaa tgg aag tgg ctg				1741
Trp Ile Gly Leu Thr Asp Ser Glu Arg Glu Asn Glu Trp Lys Trp Leu				
545	550	555		
gat ggg aca tct cca gac tac aaa aat tgg aaa gct gga cag ccg gat				1789
Asp Gly Thr Ser Pro Asp Tyr Lys Asn Trp Lys Ala Gly Gln Pro Asp				
560	565	570		
aac tgg ggt cat ggc cat ggg cca gga gaa gac tgt gct ggg ttg att				1837
Asn Trp Gly His Gly His Gly Pro Gly Glu Asp Cys Ala Gly Leu Ile				
575	580	585		
tat gct ggg cag tgg aac gat ttc caa tgt gaa gac gtc aat aac ttc				1885
Tyr Ala Gly Gln Trp Asn Asp Phe Gln Cys Glu Asp Val Asn Asn Phe				
590	595	600		
att tgc gaa aaa gac agg gag aca gta ctg tca tct gca tta				1933

31/35

Ile Cys Glu Lys Asp Arg Glu Thr Val Leu Ser Ser Ala Leu

605

610

615

laacggacig lgaigggaic acaigagcaa atttccagct cicaaaggca aaggacacic 1993

ctttctaaat gcaicacctt ccaicagat igaaaaaaaa aaaagcacig aaaaccaat 2053

actgaaaaaa aatigacagc tagtgtttt taccatccgt caaacccaa agacttggga 2113

actaaaaatg tccccagggt gataigciga tticattgt gcacatggac igaatcacat 2173

agattctcct ccgicagtaa ccgtgcgatt atacaaatia tgccttccaa agtatggaac 2233

actccaatca gaaaaagggt atcatcccg 2262

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 618

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo Sapiens

&lt;220&gt;

<223> Deduced Amino Acid Sequence of Mutated Novel Humna Scavenger Receptor from Nucleotide Sequence.

&lt;400&gt; 24

Met Lys Asp Asp Phe Ala Glu Glu Glu Glu Val Gln Ser Phe Gly Tyr

1

5

10

15

Lys Arg Phe Gly Ile Gln Glu Gly Thr Gln Cys Thr Lys Cys Lys Asn

20

25

30

Asn Trp Ala Leu Lys Phe Ser Ile Ile Leu Leu Tyr Ile Leu Cys Ala

35

40

45

Leu Leu Thr Ile Thr Val Ala Ile Leu Gly Tyr Lys Val Val Glu Lys

50

55

60

Met Asp Asn Val Thr Gly Gly Met Glu Thr Ser Arg Gln Thr Tyr Asp

65

70

75

80

32/35

Asp Lys Leu Thr Ala Val Glu Ser Asp Leu Lys Lys Leu Gly Asp Gln  
                     85                    90                    95  
 Thr Gly Lys Lys Ala Ile Ser Thr Asn Ser Glu Leu Ser Thr Phe Arg  
                     100                    105                    110  
 Ser Asp Ile Leu Asp Leu Arg Gln Gln Leu Arg Glu Ile Thr Glu Lys  
                     115                    120                    125  
 Thr Ser Lys Asn Lys Asp Thr Leu Glu Lys Leu Gln Ala Ser Gly Asp  
                     130                    135                    140  
 Ala Leu Val Asp Arg Gln Ser Gln Leu Lys Glu Thr Leu Glu Asn Asn  
 145                    150                    155                    160  
 Ser Phe Leu Ile Thr Thr Val Asn Lys Thr Leu Gln Ala Tyr Asn Gly  
                     165                    170                    175  
 Tyr Val Thr Asn Leu Gln Gln Asp Thr Ser Val Leu Gln Gly Asn Leu  
                     180                    185                    190  
 Gln Asn Gln Met Tyr Ser His Asn Val Val Ile Met Asn Leu Asn Asn  
                     195                    200                    205  
 Leu Asn Leu Thr Gln Val Gln Gln Arg Asn Leu Ile Thr Asn Leu Gln  
                     210                    215                    220  
 Arg Ser Val Asp Asp Thr Ser Gln Ala Ile Gln Arg Ile Lys Asn Asp  
 225                    230                    235                    240  
 Phe Gln Asn Leu Gln Gln Val Phe Leu Gln Ala Lys Lys Asp Thr Asp  
                     245                    250                    255  
 Trp Leu Lys Glu Lys Val Gln Ser Leu Gln Thr Leu Ala Ala Asn Asn  
                     260                    265                    270  
 Ser Ala Leu Ala Lys Ala Asn Asn Asp Thr Leu Glu Asp Met Asn Ser  
                     275                    280                    285  
 Gln Leu Asn Ser Phe Thr Gly Gln Met Glu Asn Ile Thr Thr Ile Ser  
                     290                    295                    300  
 Gln Ala Asn Glu Gln Asn Leu Lys Asp Leu Gln Asp Leu His Lys Asp

33/35

305	310	315	320
Ala Glu Asn Arg Thr	Ala Ile Lys Phe Asn Gln Leu Glu Glu Arg Phe		
325	330	335	
Gln Leu Phe Glu Thr Asp Ile Val Asn Ile Ile Ser Asn Ile Ser Tyr			
340	345	350	
Thr Ala His His Leu Arg Thr Leu Thr Ser Asn Leu Asn Glu Val Arg			
355	360	365	
Thr Thr Cys Thr Asp Thr Leu Thr Lys His Thr Asp Asp Leu Thr Ser			
370	375	380	
Leu Asn Asn Thr Leu Ala Asn Ile Arg Leu Asp Ser Val Ser Leu Arg			
385	390	395	400
Met Gln Gln Asp Leu Met Arg Ser Arg Leu Asp Thr Glu Val Ala Asn			
405	410	415	
Leu Ser Val Ile Met Glu Glu Met Lys Leu Val Asp Ser Lys His Gly			
420	425	430	
Gln Leu Ile Lys Asn Phe Thr Ile Leu Gln Gly Pro Pro Gly Pro Arg			
435	440	445	
Gly Pro Arg Gly Asp Arg Gly Ser Gln Gly Pro Pro Gly Pro Thr Gly			
450	455	460	
Asn Lys Gly Gln Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Pro Pro Gly Pro			
465	470	475	480
Ala Gly Cys Pro Pro His Trp Lys Asn Phe Thr Asp Lys Cys Tyr Tyr			
485	490	495	
Phe Ser Val Glu Lys Glu Ile Phe Glu Asp Ala Lys Leu Phe Cys Glu			
500	505	510	
Asp Lys Ser Ser His Leu Val Phe Ile Asn Thr Arg Glu Glu Gln Gln			
515	520	525	
Trp Ile Lys Lys Gln Met Val Gly Arg Glu Ser His Trp Ile Gly Leu			
530	535	540	

34/35

Thr Asp Ser Glu Arg Glu Asn Glu Trp Lys Trp Leu Asp Gly Thr Ser  
 545                      550                      555                      560  
 Pro Asp Tyr Lys Asn Trp Lys Ala Gly Gln Pro Asp Asn Trp Gly His  
 565                      570                      575  
 Gly His Gly Pro Gly Glu Asp Cys Ala Gly Leu Ile Tyr Ala Gly Gln  
 580                      585                      590  
 Trp Asn Asp Phe Gln Cys Glu Asp Val Asn Asn Phe Ile Cys Glu Lys  
 595                      600                      605  
 Asp Arg Glu Thr Val Leu Ser Ser Ala Leu  
 610                      615

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Sequence of a Primer for PCR Amplification of hSRCL-P1.

&lt;400&gt; 25

ccgctcgagc ggtcaccatg aaagacgact

30

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Sequence of a Primer for PCR Amplification of hSRCL-P1.



35/35

&lt;400&gt; 26

tccccgcggt aatgcagatg acagtaactgt

30

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Sequence of a Primer for PCR Amplification of hSRCL-P1.

&lt;400&gt; 27

aatgcggccg caccatgaaa gacgacitcg cagag

35

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Sequence of a Primer for PCR Amplification of hSRCL-P1.

&lt;400&gt; 28

gcctciagacc gcgglaaatgc agatgacagc ac

32

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/00874

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/47, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02, C07K16/28,  
C12P21/08, A01K67/027, A61K45/00,  
A61P9/10, A61P3/06, A61P3/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/47, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02, C07K16/28,  
C12P21/08, A01K67/027, A61K45/00,  
A61P9/10, A61P3/06, A61P3/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JICST FILE (JOIS),  
SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 98/55614, A2 (GENETICS INSTITUTE, INC.), 10 December, 1998 (10.12.98) & AU, 9878072, A & EP, 1003855, A2	1-20, 23, 25, 29
P, X	WO, 00/11161, A (FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.), 02 March, 2000 (02.03.00) & AU, 5305699, A	1-20, 23, 25, 29
A	Proc.Natl.Acad.Sci.USA, Vol.87, No.23, (1990), Matsumoto A, et al., "Human macrophage scavenger receptors: primary structure, expression, and localization in atherosclerotic lesions", pp.9133-9137	1-20, 23, 25, 29
A	Nature, Vol.343, No.6258, (1990) Kodama T, et al., "Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils", pp.531-535	1-20, 23, 25, 29
A	Annu.Rev.Biochem., Vol.63, (1994), Krieger M, et al., "Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP)", pp.601-637	1-20, 23, 25, 29

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not  
considered to be of particular relevance"E" earlier document but published on or after the international filing  
date"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is  
cited to establish the publication date of another citation or other  
special reason (as specified)"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other  
means"P" document published prior to the international filing date but later  
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or  
priority date and not in conflict with the application but cited to  
understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered novel or cannot be considered to involve an inventive  
step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered to involve an inventive step when the document is  
combined with one or more other such documents, such  
combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
07 March, 2001 (07.03.01)

Date of mailing of the international search report  
21 March, 2001 (21.03.01)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/00874

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 27,31  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions as claimed in the above claims pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search.

2. ☒ Claims Nos.: 21,22,24,26,28,30,32  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Concerning "agonist", "antagonist" and "drug" in the above claims, a general method of isolating a substance stimulating or inhibiting the activity of the proteins of the invention is merely stated in the description. Namely, no particular compound is described therein. Such being the case, it is unknown what particular substances are involved in the scopes of the above-described "agonist" etc. Therefore, the above claims are described in an extremely unclear manner and thus no meaningful international search can be practiced on these claims.

3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N15/12, C07K14/47, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02, C07K16/28, C12P21/08, A01K67/027, A61K45/00, A61P9/10, A61P3/06, A61P3/10

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N15/12, C07K14/47, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02, C07K16/28, C12P21/08, A01K67/027, A61K45/00, A61P9/10, A61P3/06, A61P3/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JICST771M (JOIS),  
SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 98/55614, A2 (GENETICS INSTITUTE, INC.) 10.12月.1998 (10.12.98) &AU, 9878072, A &EP, 1003855, A2	1-20, 23, 25, 29
P, X	WO, 00/11161, A (FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.) 2.3月.2000 (02.03.00) &AU, 5305699, A	1-20, 23, 25, 29

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.03.01

国際調査報告の発送日

21.03.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

北村 弘樹

印

4B

2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 87, No. 23, (1990), Matsumoto A, et al., "Human macrophage scavenger receptors: primary structure, expression, and localization in atherosclerotic lesions", p. 9133-9137	1-20, 23, 25, 29
A	Nature, Vol. 343, No. 6258, (1990) Kodama T, et al., "Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils", p. 531-535	1-20, 23, 25, 29
A	Annu. Rev. Biochem., Vol. 63, (1994), Krieger M, et al., "Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor- related protein (LRP)", p. 601-637	1-20, 23, 25, 29

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 27, 31 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
前記請求の範囲に記載された発明は、人の身体の治療による処置方法に係る発明であるから、国際調査を要しないものである。
2. ☒ 請求の範囲 21, 22, 24, 26, 28, 30, 32 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
前記請求の範囲の「アゴニスト」、「アンタゴニスト」、及び、「薬物」について、明細書には、本発明のタンパク質の活性を刺激あるいは阻害する物質を単離する一般的な方法が記載されているのみであり、具体的な化合物については何ら記載されていない。してみると、上記「アゴニスト」等に具体的にどのような物質が含まれるのかが不明であるから、前記請求の範囲の記載は著しく不明確である。したがって、前記請求の範囲については、有意義な国際調査をすることができない。
3. ☐ 請求の範囲                      は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/00874

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/47, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02, C07K16/28,  
C12P21/08, A01K67/027, A61K45/00,  
A61P9/10, A61P3/06, A61P3/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/47, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02, C07K16/28,  
C12P21/08, A01K67/027, A61K45/00,  
A61P9/10, A61P3/06, A61P3/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), JICST FILE(JOIS),  
SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 98/55614, A2 (GENETICS INSTITUTE, INC.), 10 December, 1998 (10.12.98) & AU, 9878072, A & EP, 1003855, A2	1-20, 23, 25, 29
P, X	WO, 00/11161, A (FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.), 02 March, 2000 (02.03.00) & AU, 5305699, A	1-20, 23, 25, 29
A	Proc.Natl.Acad.Sci.USA, Vol.87, No.23, (1990), Matsumoto A, et al., "Human macrophage scavenger receptors: primary structure, expression, and localization in atherosclerotic lesions", pp.9133-9137	1-20, 23, 25, 29
A	Nature, Vol.343, No.6258, (1990) Kodama T, et al., "Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils", pp.531-535	1-20, 23, 25, 29
A	Annu.Rev.Biochem., Vol.63, (1994), Krieger M, et al., "Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP)", pp.601-637	1-20, 23, 25, 29

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
07 March, 2001 (07.03.01)

Date of mailing of the international search report  
21 March, 2001 (21.03.01)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/00874

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 27,31

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions as claimed in the above claims pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search.

2. ☒ Claims Nos.: 21,22,24,26,28,30,32

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Concerning "agonist", "antagonist" and "drug" in the above claims, a general method of isolating a substance stimulating or inhibiting the activity of the proteins of the invention is merely stated in the description. Namely, no particular compound is described therein. Such being the case, it is unknown what particular substances are involved in the scopes of the above-described "agonist" etc. Therefore, the above claims are described in an extremely unclear manner and thus no meaningful international search can be practiced on these claims.

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N15/12, C07K14/47, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02, C07K16/28, C12P21/08, A01K67/027, A61K45/00, A61P9/10, A61P3/06, A61P3/10

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N15/12, C07K14/47, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02, C07K16/28, C12P21/08, A01K67/027, A61K45/00, A61P9/10, A61P3/06, A61P3/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), JICST774\*(JOIS),  
SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 98/55614, A2 (GENETICS INSTITUTE, INC.) 10. 12月. 1998 (10. 12. 98) &AU, 9878072, A &EP, 1003855, A2	1-20, 23, 25, 29
P, X	WO, 00/11161, A (FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.) 2. 3月. 2000 (02. 03. 00) &AU, 5305699, A	1-20, 23, 25, 29

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に関する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07. 03. 01

国際調査報告の発送日

21.03.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

北村 弘樹

印

4B

2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 87, No. 23, (1990), Matsumoto A, et al., "Human macrophage scavenger receptors: primary structure, expression, and localization in atherosclerotic lesions", p. 9133-9137	1-20, 23, 25, 29
A	Nature, Vol. 343, No. 6258, (1990) Kodama T, et al., "Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils", p. 531-535	1-20, 23, 25, 29
A	Annu. Rev. Biochem., Vol. 63, (1994), Krieger M, et al., "Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor- related protein (LRP)", p. 601-637	1-20, 23, 25, 29

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 27, 31 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
前記請求の範囲に記載された発明は、人の身体の治療による処置方法に係る発明であるから、国際調査を要しないものである。
2. ☒ 請求の範囲 21, 22, 24, 26, 28, 30, 32 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
前記請求の範囲の「アゴニスト」、「アンタゴニスト」、及び、「薬物」について、明細書には、本発明のタンパク質の活性を刺激あるいは阻害する物質を単離する一般的な方法が記載されているのみであり、具体的な化合物については何ら記載されていない。してみると、上記「アゴニスト」等に具体的にどのような物質が含まれるのかが不明であるから、前記請求の範囲の記載は著しく不明確である。したがって、前記請求の範囲については、有意義な国際調査をすることができない。
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**PCT**WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau

## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification <sup>6</sup> : C12N 15/12, C07K 14/47, A61K 38/17		A2	(11) International Publication Number: <b>WO 98/55614</b> (43) International Publication Date: 10 December 1998 (10.12.98)
(21) International Application Number: PCT/US98/11210 (22) International Filing Date: 1 June 1998 (01.06.98) (30) Priority Data: 08/868,899 4 June 1997 (04.06.97) US 08/868,898 4 June 1997 (04.06.97) US 08/869,192 4 June 1997 (04.06.97) US 08/869,191 4 June 1997 (04.06.97) US 08/869,193 4 June 1997 (04.06.97) US 08/868,697 4 June 1997 (04.06.97) US 08/868,698 4 June 1997 (04.06.97) US 08/868,900 4 June 1997 (04.06.97) US 08/868,696 4 June 1997 (04.06.97) US 08/869,194 4 June 1997 (04.06.97) US 09/087,255 29 May 1998 (29.05.98) US (71) Applicant: GENETICS INSTITUTE, INC. [US/US]; 87 CambridgePark Drive, Cambridge, MA 02140 (US).		(72) Inventors: JACOBS, Kenneth; 151 Beaumont Street, Newton, MA 02160 (US). McCOY, John, M.; 56 Howard Street, Reading, MA 01867 (US). LAVALLIE, Edward, R.; 113 Ann Lee Road, Harvard, MA 01451 (US). RACIE, Lisa, A.; 124 School Street, Acton, MA 01720 (US). TREACY, Maurice; 93 Walcott Road, Chestnut Hill, MA 02167 (US). SPAULDING, Vikki; 11 Meadowbank Road, Billerica, MA 01821 (US). AGOSTINO, Michael, J.; 26 Wolcott Avenue, Andover, MA 01810 (US). HOWES, Steven, H.; Apartment 2, 44 Chester Street, Somerville, MA 02144 (US). FECHTEL, Kim; 46 Marion Road, Arlington, MA 02174 (US). (74) Agent: SPRUNGER, Suzanne, A.; Genetics Institute, Inc., 87 CambridgePark Drive, Cambridge, MA 02140 (US). (81) Designated States: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  Published Without international search report and to be republished upon receipt of that report.	
(54) Title: SECRETED PROTEINS AND POLYNUCLEOTIDES ENCODING THEM			
(57) Abstract  Polynucleotides and the proteins encoded thereby are disclosed.			





PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, C07K 14/435, C12N 5/10, C12P 21/02, C07K 16/18, C12P 21/02, C07K 16/18, C12P 21/08, G01N 33/53, A01K 67/027 // (C12N 5/10, C12R 1:91) (C12P 21/02, C12R 1:91) (C12P 21/02, C12R 1:91)</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/11161</p> <p>(43) 国際公開日 2000年3月2日(02.03.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04552</p> <p>(22) 国際出願日 1999年8月24日(24.08.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/237611 1998年8月24日(24.08.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 扶桑薬品工業株式会社 (FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.)(JP/JP) 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 若宮伸隆(WAKAMIYA, Nobutaka)(JP/JP) 〒567-0826 大阪府茨木市大池1丁目9-20 Osaka, (JP)</p> <p>(74) 代理人 角田嘉宏, 外(SUMIDA, Yoshihiro et al.) 〒650-0031 兵庫県神戸市中央区東町123番地の1 貿易ビル3階 有古特許事務所 Hyogo, (JP)</p>	<p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54)Title: NOVEL COLLECTIN</p> <p>(54)発明の名称 新規コレクチン</p> <p>(57) Abstract Novel collectin-related molecules expected as exerting antibacterial and antiviral activities, etc. particularly in the human body, namely, a novel collectin gene containing the base sequence represented by SEQ ID NO:1 and a novel collectin containing the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2; and a method with the use of the same.</p>		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**